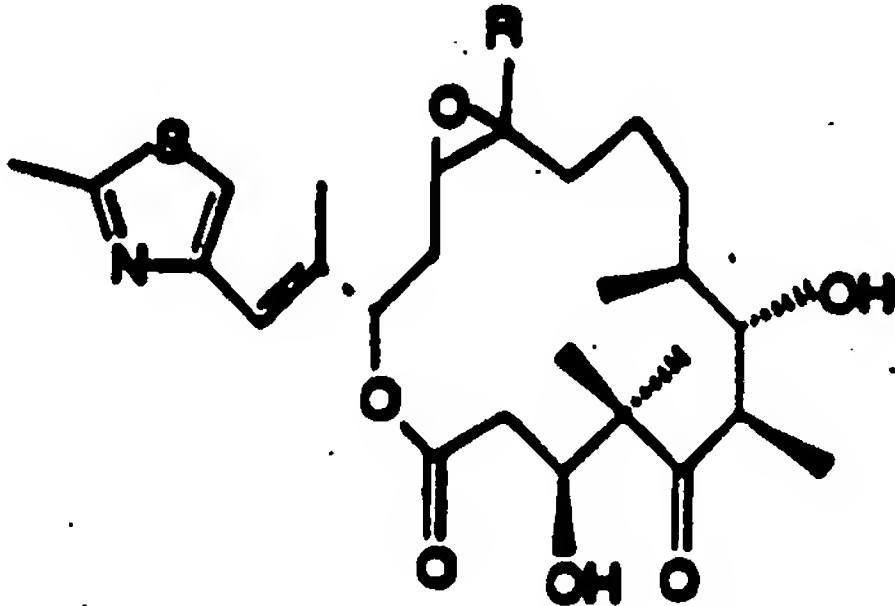
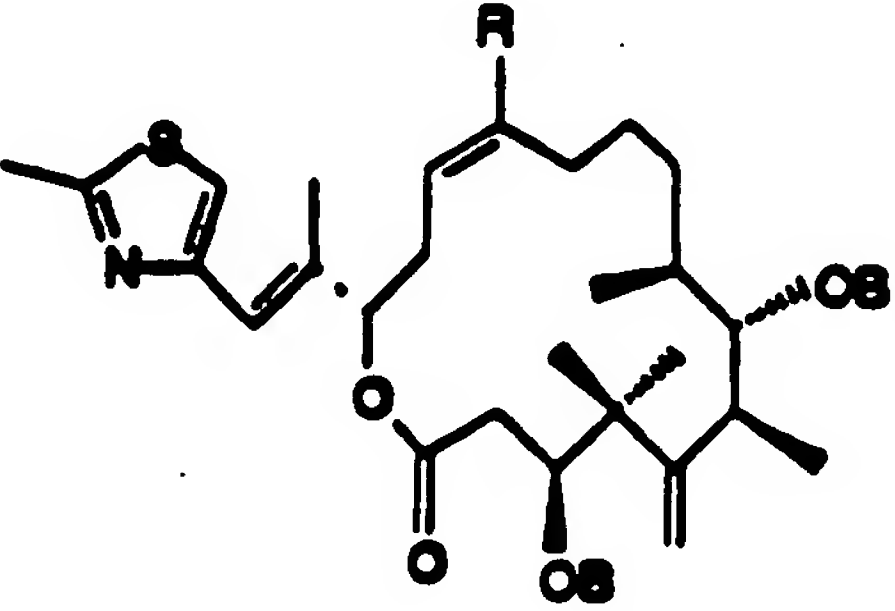




AU9721493

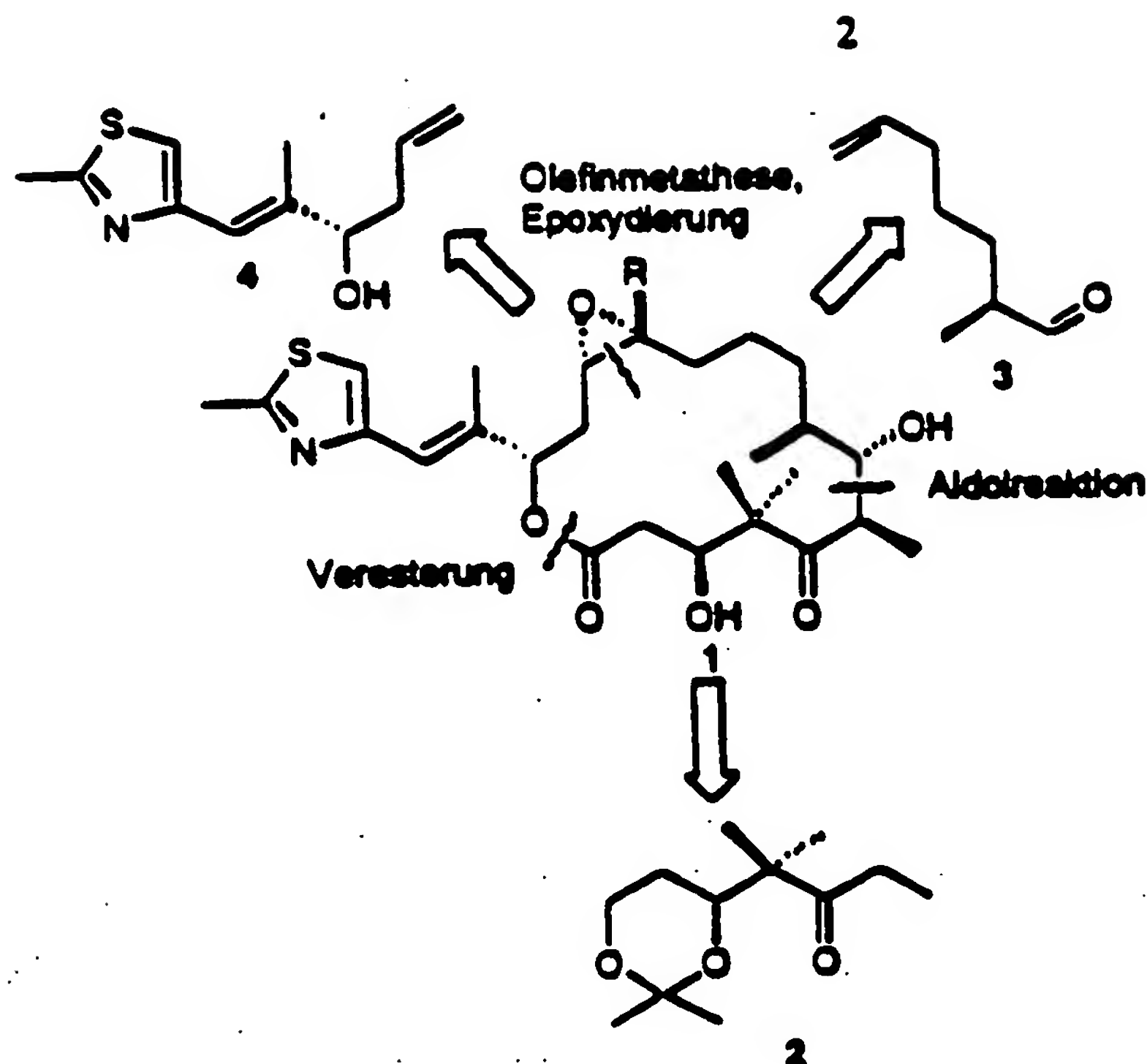
(51) Internationale Patentklassifikation 6: <b>C07D 493/04, C07C 47/21, C07D 319/06, 277/24, C07C 59/01</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/08849</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>5. März 1998 (05.03.98)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE97/00111</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), curasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TO).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>15. Januar 1997 (15.01.97)</b>		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(30) Prioritätsdaten: 196 36 343.8 30. August 1996 (30.08.96) DE 196 45 361.5 28. Oktober 1996 (28.10.96) DE 196 45 362.3 28. Oktober 1996 (28.10.96) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>NOVARTIS AKTIENGESELLSCHAFT (CH/CH); Schwarzwalddalen 215, CH-4058 Basel (CH).</b>			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>SCHINZER, Dieter (DE/DE); Neuköllnstrasse 33, D-38106 Braunschweig (DE); LIMBERG, Anja (DE/DE); Autorsstrasse 1a, D-38102 Braunschweig (DE); BÖHM, Oliver, M. (DE/DE); Kreuzstrasse 109, D-38118 Braunschweig (DE); BAUER, Armin (DE/DE); Spielmannstrasse 16, D-38106 Braunschweig (DE); CORDES, Martin (DE/DE); Aha-Wiegk-Ring 12, D-38106 Braunschweig (DE).</b>			
(54) Titel: <b>METHOD FOR PRODUCING EPOTHILONES, AND INTERMEDIATE PRODUCTS OBTAINED DURING THE PRODUCTION PROCESS</b>			
(54) Bezeichnung: <b>VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON EPOTHILONEN UND ZWISCHENPRODUKTE INNERHALB DES VERFAHRENS</b>			
(57) Abstract			
<p>The invention pertains to a method for producing epothilones and also relates to intermediate products obtained during the production process. Epothilones A and B are natural substances which can be produced by microorganisms and have similar properties to those of taxol and, therefore, are of interest to the pharmaceutical chemistry.</p>			
<p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von Epothilonen und Zwischenprodukte innerhalb des Verfahrens. Epothilon A und B sind Naturstoffe, die durch Mikroorganismen hergestellt werden können und die Taxol-ähnliche Eigenschaften besitzen und somit besonderes Interesse in der Arzneimittelforschung besitzen.</p>			

## Verfahren zur Herstellung von Epothilonen und Zwischenprodukte Innerhalb des Verfahrens

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von Epothilonen und Zwischenprodukte Innerhalb des Verfahrens.

Epothilone 1 (DE 41 38 042 C2) stellen eine neue Klasse Tubulin-stabilisierender Naturstoffe mit Taxol-artiger Wirkung dar. Besonders ihre cytotoxische Wirkung gegenüber Arzneimittel-resistenten Tumorzelllinien ist von enormer Bedeutung für eine potentielle Anwendung in der Krebstherapie [ G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomburg, K. Gerth, H. Reichenbach *Angew. Chem.* 1996, 108, 1671; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, 35, 1567; D. Schinzer "Epothilones - New Promising Microtubule-stabilizing Natural Products with Taxol-like Biological Activity", *Eur. Chem. Chron.* 1996, 1, 7; D. M. Bollag, P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, C. M. Woods, *Cancer Res.* 1995, 55, 2325].

Epothilone 1 (A: R = H, B: R = Me) wurden kürzlich aus Myxobakterien isoliert und sind über Fermentation zugänglich. Bedingt durch die sehr interessanten biologischen Eigenschaften ist die Synthese der Epothilone von größter Bedeutung. Gegenstand der Erfindung ist die Totalsynthese von Epothilon A und B 1.

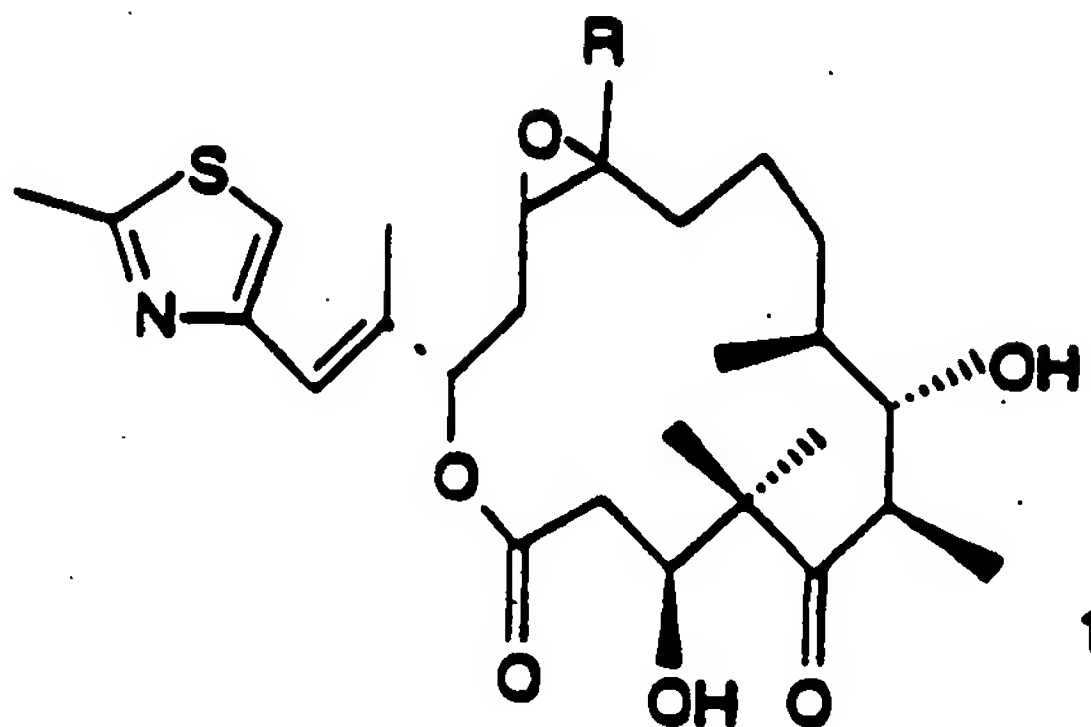


Schema 1. Retrosynthetische Analyse.

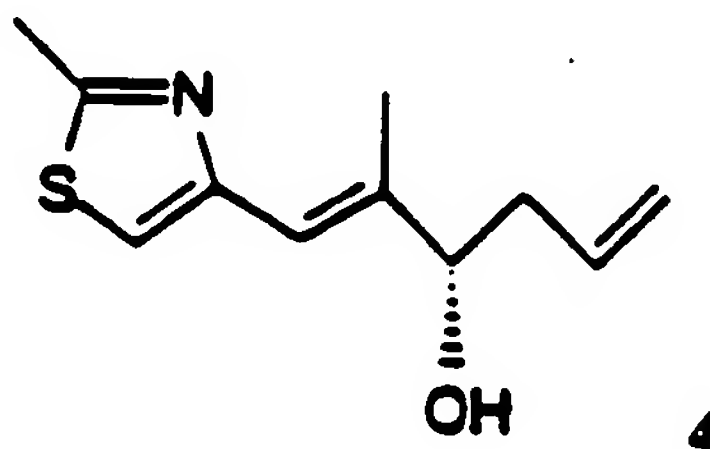
[D. Schinzer, A. Limberg, O. M. Böhm, *Chem. Eur. J.* 1996, 2, 1477].

Epothilone 1 sind in konvergenter Reaktionsführung aus den drei Bausteinen 2, 3 und 4 zugänglich. Wie die Retrosynthese in Schema 1 zeigt, werden die Baustein 2 und 3 in einer stereoselektiven Aldolreaktion verknüpft. Eine Veresterung mit Fragment 4 liefert das fast vollständig funktionalisierte Fragment 17, welches in einer Ringschlußmetathese zu Deoxy-epothilon A 19 cyclisiert wird. Eine abschließende Epoxidierung liefert schließlich 1. Der Schlüsselschritt in der Synthese ist die stereoselektive Aldolreaktion der Fragmente 2 und 3 (zugänglich aus der kommerziell erhältlichen Heptensäure). Unter kinetisch kontrollierten Reaktionsbedingungen in Gegenwart von LDA erhält man in 70% Ausbeute ausschließlich die gewünschte Verbindung 5 mit den vier korrekt platzierten Asymmetriezentren. Es kommt hier offensichtlich durch eine doppelte Stereodifferenzierung zu einer chiralen Übersteuerung der bevorzugten Cram-Selektivität des Aldehyds 3, da beide Reaktionspartner in optisch aktiver Form eingesetzt werden.

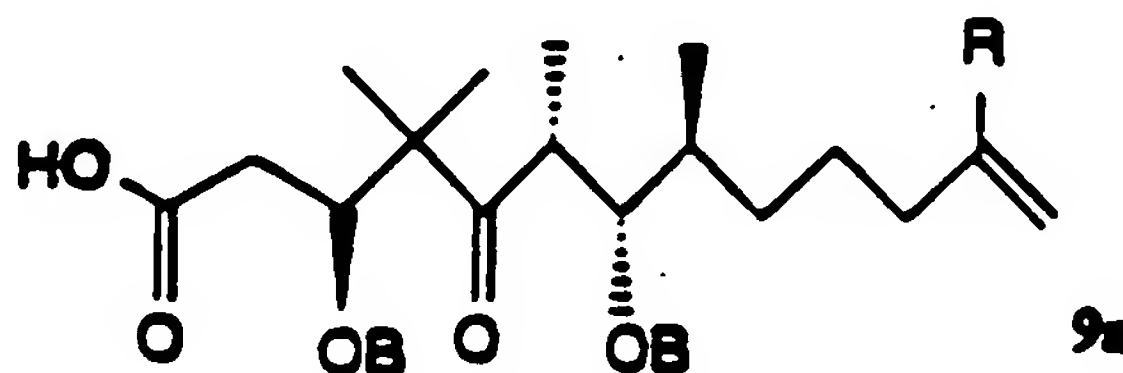
Die Erfindung betrifft also ein Verfahren zur Herstellung von Epitholon A oder B der allgemeinen Formel 1



worin R=Wasserstoff (A) oder eine Methylgruppe (B) bedeuten,  
wobei ein Thiazolalkyldien-alkohol-derivat der Formel 4



mit einer Carbonsäure der allgemeinen Formel 9a



worin B= Benzyl-, Tetrahydropyranyl- und/oder eine Silylschutzgruppe(n) und  
R=Wasserstoff oder Methyl  
bedeuten,

verestert wird, der erhaltene Ester mittels einer Olefinmetathese in Gegenwart eines Edelmetallkatalysators ringgeschlossen, gegebenenfalls die Hydroxylschutzgruppen

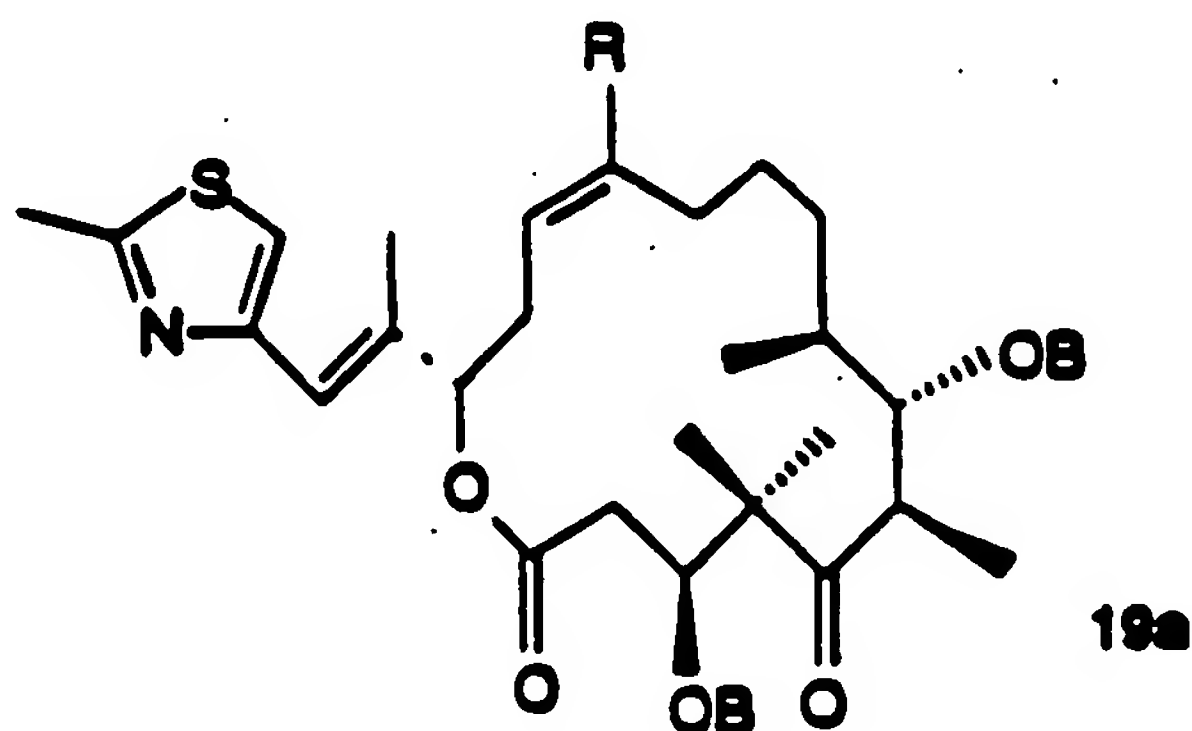
gespalten werden, die neu entstandene Doppelbindung epoxidiert wird und gegebenenfalls die Hydroxylschutzgruppen gespalten werden.

Als Silylschutzgruppen B eignen sich in der Regel alle unterschiedlichen Trialkyl- oder Diaryl-alkyl-silylschutzgruppen, insbesondere die tert.-Butyl-dimethyl-, Trimethylsilyl- und Diphenyl-tert.-butyl-silylgruppen.

Die Derivate 4a und 9a werden verestert, vorzugsweise durch Anwendung von DCCl/DMAP und der so erhaltene Ester mit den zwei endständigen Alkengruppen wird durch Olefinmetathese, vorzugsweise durch Anwendung von  $\text{RuCl}_2(=\text{CHPh})(\text{PCy}_3)_2$  (Grubbs-Katalysator) ringgeschlossen (J. Org. Chem. 1996, 61, 3942 - 3943; Tetrahedron 1996, 52, 7251 - 7264; J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 12364 - 12365; J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 2943 - 2944 und Tetrahedron Lett.: 1994, 35, 3191 - 3194, J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 6634 - 6640 und J. Am. Chem. Soc., 1995, 118, 100 - 110.

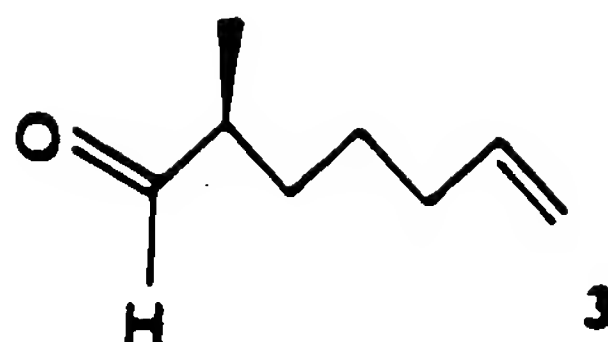
Die Epoxidierung der neu entstandenen Doppelbindung erfolgt vorzugsweise mittels Persäure, z. B. Perchlorsäuresäure, oder Peroxid, z. B. Cumolhydroperoxid oder Dimethyldioxiran.

Weiter beinhaltet die Erfindung Desoxy-epothilone gemäß allgemeiner Formel 19a

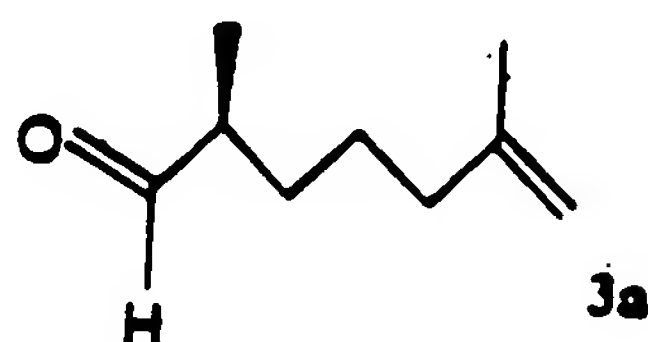


worin B = Wasserstoff, Benzyl-, p-Methoxybenzyl-, Tetrahydropyranyl- und/oder eine Silylschutzgruppe(n) und R = Wasserstoff oder Methyl bedeuten,  
 ( 2-(2,2-Dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)-2-methyl-pentan-3-on) 2,  
 2-Methyl-6-heptenal 3

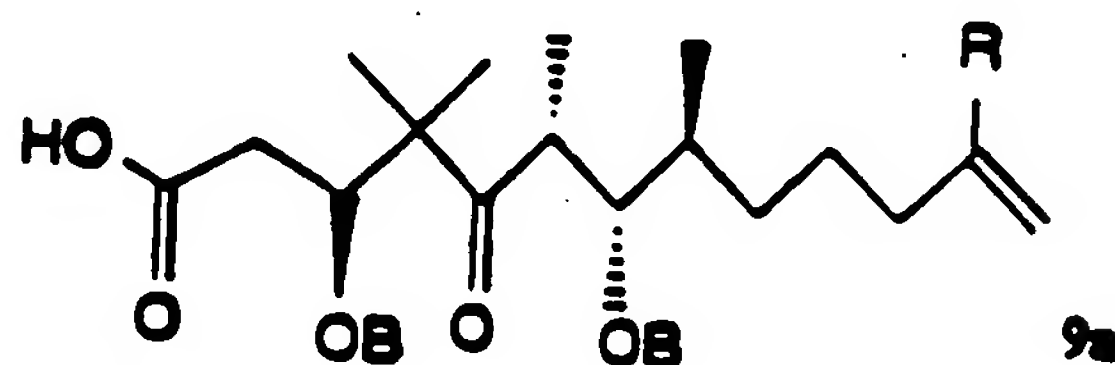
5



und 2,6-Dimethyl-6-heptenal 3a,

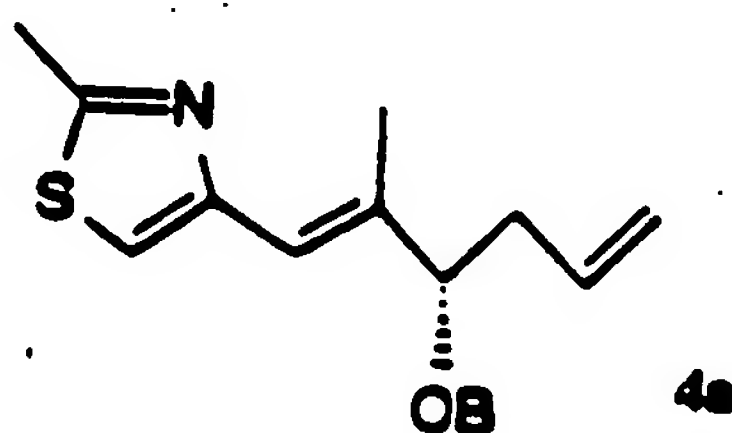


und Verbindungen der allgemeinen Formel 9a



worin B= Benzyl-, Tetrahydropyranyl- und/oder eine Silylschutzgruppe(n) und  
R=Wasserstoff oder Methyl,  
bedeuten,

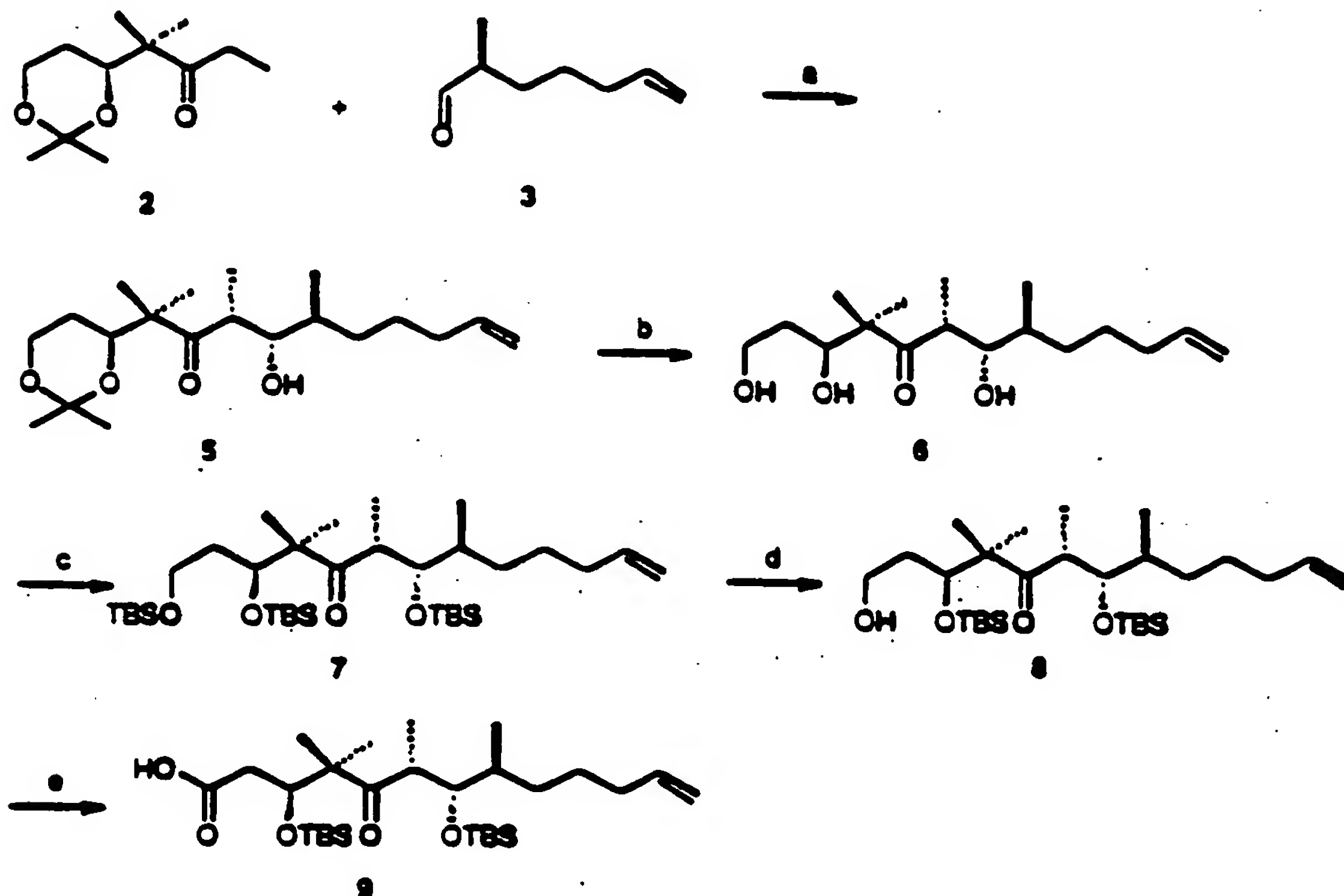
und die Bedeutung von B im Molekül unterschiedlich sein kann,  
und Verbindungen der allgemeinen Formel 4a



worin

B=Wasserstoff, Benzyl-, p-Methoxybenzyl-, Tetrahydropyranyl- oder eine  
Silylschutzgruppe bedeutet und  
(4S,6S)-2-(2,2-dimethyl-[1,3] dioxan-4-yl)-5-hydroxy-

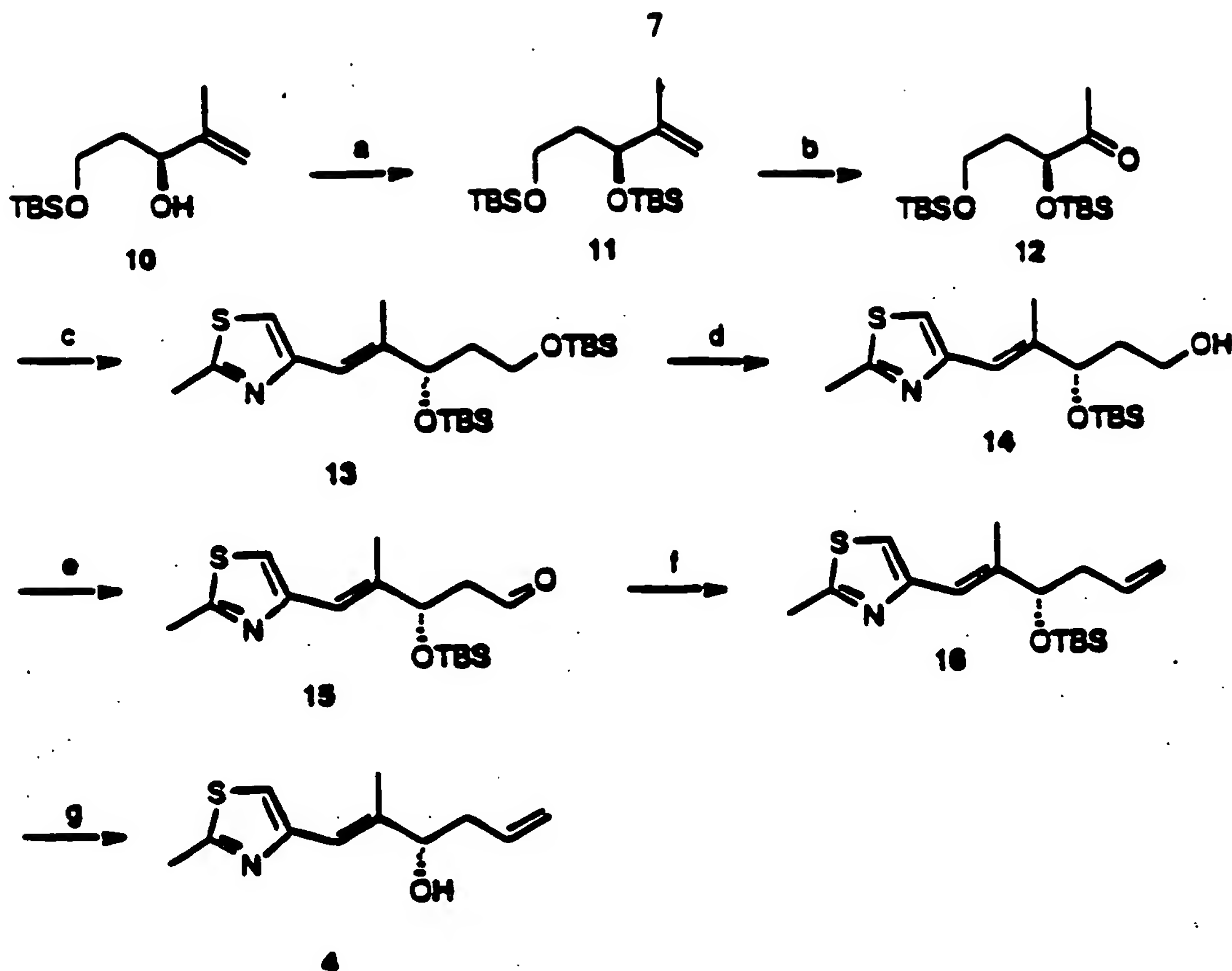
sowie Stereoisomere der beanspruchten Verbindungen.



Schema 2. a) LDA, THF, - 78 °C, 70%; b) Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS), MeOH, RT, 36 h, 88%; c) 12 Äq.  $\text{BuMe}_2\text{SiOTf}$  (Tf = Trifluormethansulfonat), 6 Äq. 2,6-Lutidin,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , - 78 °C, 96%; d) 0.2 Äq. CSA (Camphersulfonsäure), MeOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C, 5 h, 82%; e) 11 Äq. Pyridiniumdichromat (PDC), DMF, RT, 36 h, 79%.

Die Spaltung des Acetonids 5 zum Triol 6 gelingt glatt in Gegenwart von Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS). Eine sich anschließende Trisilylierung mit TBSOTf und Lutidin als Hilfsbase liefert die gewünschte Verbindung 7. Um die Oxidation zur Säure 9 zu ermöglichen, muß selektiv die primäre Silylgruppe abgespalten werden. Dies gelingt glatt in Gegenwart von Camphersulfonsäure (CSA) und generiert Verbindung 8. Eine abschließende Oxidation mit Pyridiniumdichromat (PDC) produziert Fragment 9, welches die C1-C12-Untereinheit von 1 darstellt.





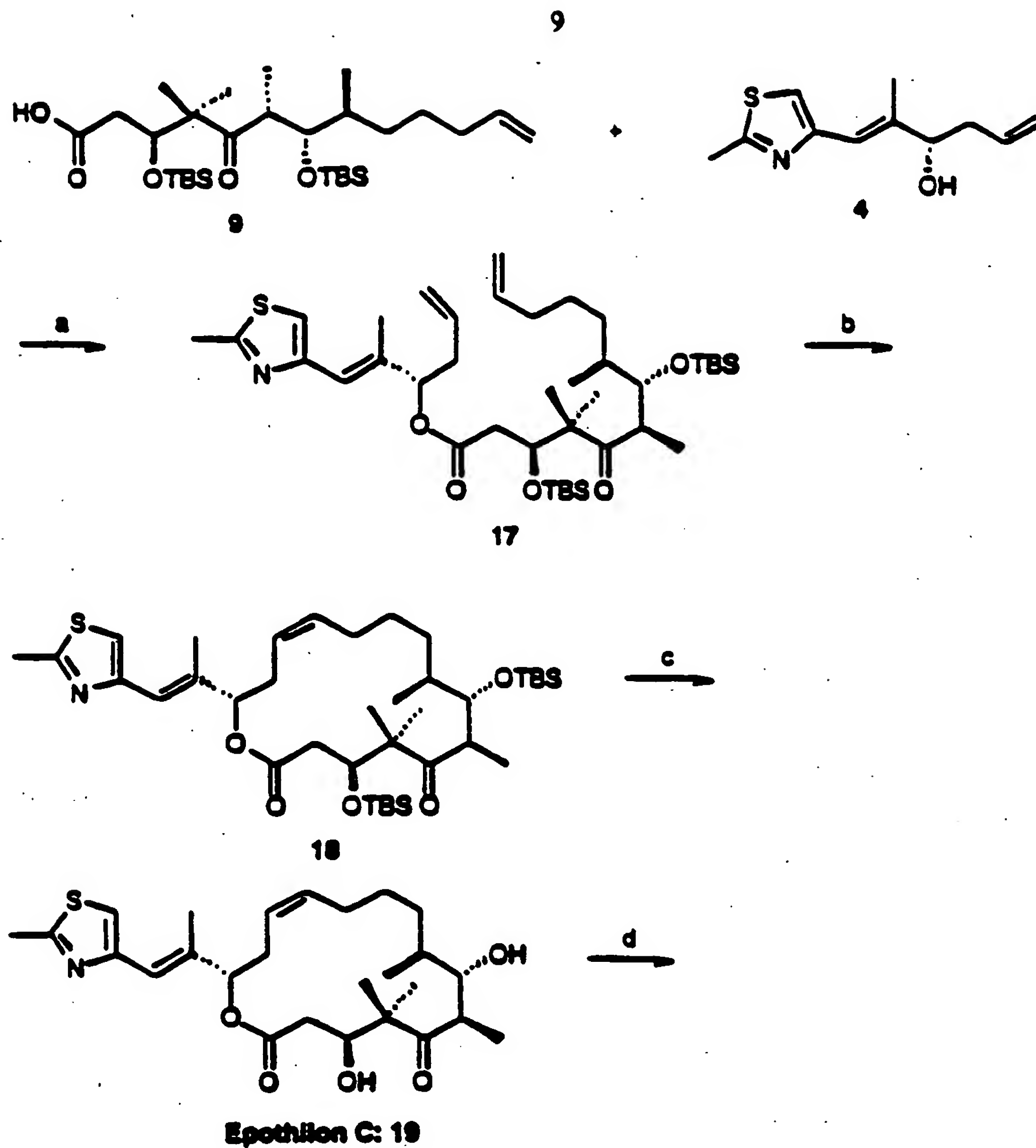
Schema 3. a) TBSCl, Imidazol, DMF, RT, 10 h, 98%; b) O<sub>3</sub>, PPh<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, - 78 °C, 70%; c) 1.5 Äq. Diethyl (2-methylthiazol-4-yl)methanphosphonat, *n*BuLi, THF, - 78 °C -> RT, 75%; d) HF, MeCN, einige Glassplitter, 0 °C, 87%; e) Dess-Martin-Periodinan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 1 h, 78%; f) 1.85 Äq. PPh<sub>3</sub>MeBr/NaNH<sub>2</sub>, THF, RT, 20 min., 83%; g) 2.5 Äq. Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF), Molsieb 4 A, THF, - 78 °C -> RT, 99%.

Der über eine Sharpless Resolution zugängliche (S)-Alkohol 10 [D. Schinzer, A. Limberg, O. M. Böhm, *Chem. Eur. J.* 1996, 2, 1477] wurde zunächst mit TBSCl silyliert, anschließend zum Methylketon 12 ozonisiert und in einer stereoselektiven Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion zum tricyclischen Olefin 13 umgesetzt. Eine selektive Desilylierung mit HF in Acetonitril liefert Verbindung 14. Die Desilylierung zu 14 funktioniert nur in Gegenwart einiger Glassplitter, offensichtlich wird die Reaktion durch H<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub> katalysiert. Dess-Martin Oxidation, gefolgt von einer Wittig-



Olefinierung generiert Verbindung 16, die in einer abschließenden Desilylierung mit TBAF in THF Segment 4 liefert.

Die Veresterung der Bausteine 9 und 4 in Gegenwart von DCC und 4-DMAP erzeugt Verbindung 17, welche in stereochemisch homogener Form isoliert wird.

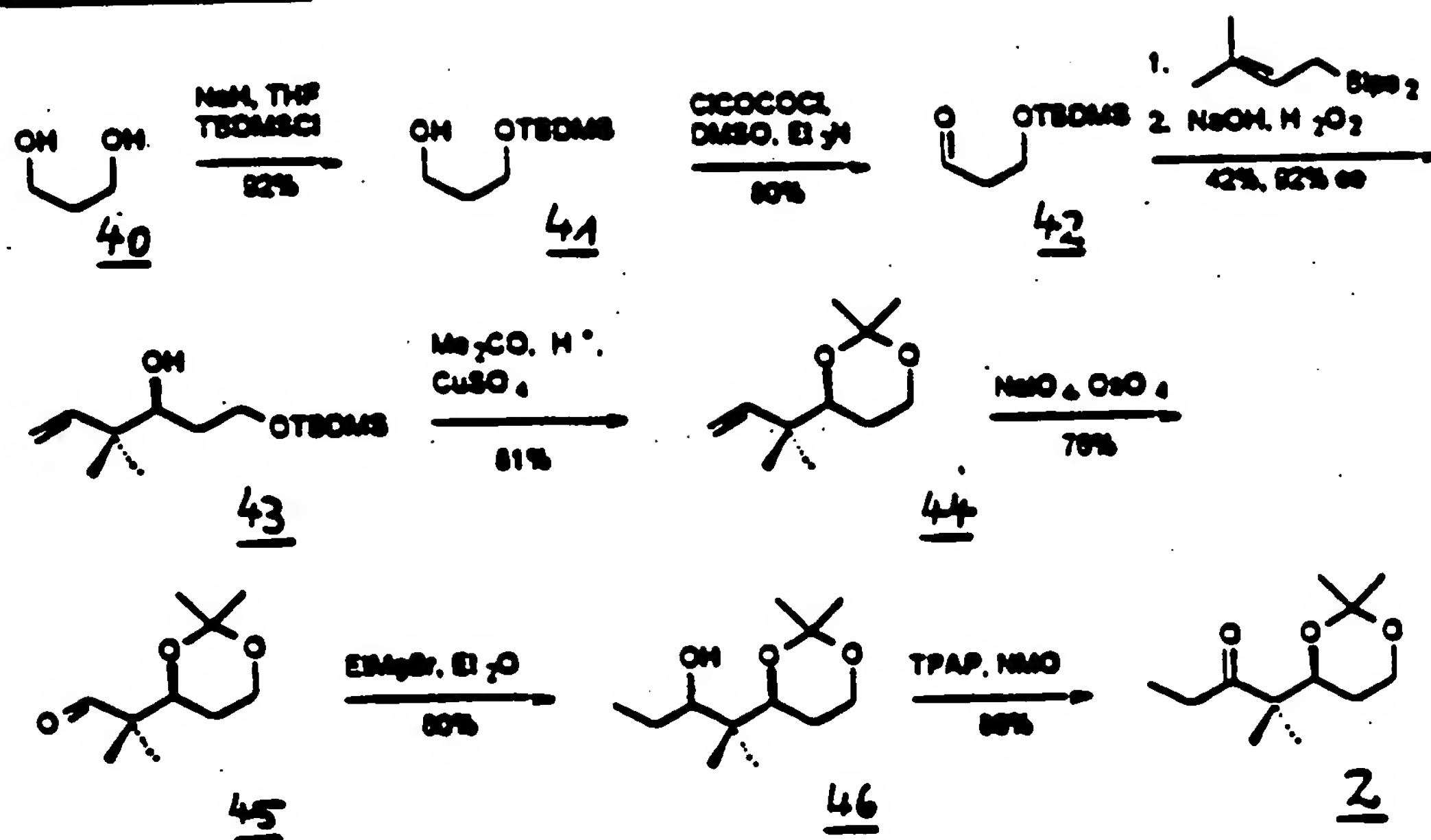
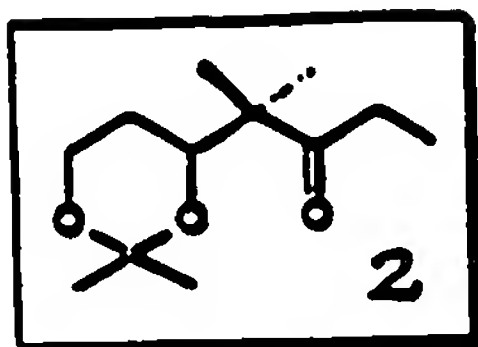


Scheme 4. a) 1.3 eq. Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 0.2 eq. 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, 12 h, 80%; b)  $\text{Cl}_2[\text{RuCHPh}](\text{PCy}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, 12 h, 94% (Z: E = 1 : 1); c) HF, MeCN,  $\text{Et}_2\text{O}$ , RT, 12 h, 65%, d) Dimethyldioxiran,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , - 35 °C, 2 h, 48%.

Ringschlußmetathese mit  $\text{Cl}_2[\text{RuCHPh}](\text{PCy}_3)_2$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  liefert 18 als Diastereomerengemisch ( $Z:E = 1:1$ ) in 94% Ausbeute. Den Abschluß der Totalsynthese bilden die Desilylierung mit HF in Acetonitril/Ether zu 19 und eine regio- und stereoselektive Epoxydierung mit Dimethyldioxiran zu 1. Das Hauptprodukt dieser Reaktion ist (-)-Epothilon A, das chromatographisch und spektroskopisch mit einer authentischen Probe identisch ist.

Insgesamt wurde eine streng konvergente Synthese beschrieben, welche viele Optionen zu Analoga offenhält, was im Hinblick auf die biologische Aktivität bedeutsam ist. Die gesamte Synthese kommt mit einem Schutzgruppentyp aus (TBS), welche in selektiven Reaktionen geknüpft oder abgespalten werden. Die stereoselektive Aldolreaktion ist hoch und stellt ein weiteres beeindruckendes Beispiel der chiralen Übersteuerung der Aldehydselektivität mit einem chiralen Enolat dar. Die Ringschlußmetathese zu 18 gelingt in 94% isolierter Ausbeute, liefert jedoch ein 1 : 1 Gemisch der Z- und E-Isomere. Das biologisch deutlich wirksamere Epothilon B 1 ( $R = \text{Me}$ ) ist über den gleichen Herstellungsweg zugänglich.

## Herstellung von 2



**Arbeitsvorschriften zur Synthese von Segment 2**

(2-(2,2-Dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)-2-methyl-pentan-3-on)

[D. Schinzer, A. Limberg, O. M. Böhm, *Chem. Eur. J.* 1996, 2, 1477].

Das 3-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]propanal 42 wird ausgehend von Propan-1,3-diol 40 hergestellt, indem zunächst nach einer Methode von P.G. McDougal, J.G. Rico, Y. Oh, B.D. Condon, *J. Org. Chem.* 1986, 51, 3388-3390, zum 3-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-1-propanol 41 monosilyliert wird, das anschließend mit DMSO/ Oxalylchlorid zum Aldehyd 42 oxidiert wird (A. Jenmalm, W. Berts, Y. Li, K. Luthmann, I. Csöregi, U. Hackzell, *J. Org. Chem.* 1994, 59, 1139-1148).

Darstellung von 1-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-4,4-dimethyl-hex-5-en-3-ol 43  
(H.C. Brown, P.K. Jadhav, *Tetrahedron Lett.* 1984, 25, 1215-1218; P.K. Jadhav, K.S. Bhat und P. Thirumalai, H.C. Brown, *J. Org. Chem.* 1986, 51, 432-439)

Zu einer auf -25°C gekühlten Suspension von  $\text{Ipc}_2\text{BH}$  (7.34 mmol, hergestellt aus (-)- $\alpha$ -Pinen [99 %, 97 % ee] H.C. Brown, M.C. Desai, P.K. Jadhav, *J. Org. Chem.* 1982, 47, 5065-5069; H.C. Brown, B. Singaram, *J. Org. Chem.* 1984, 49, 945-947) in 2.6 ml THF wird 500 mg (7.34 mmol, 1 equiv) 3-Methyl-1,2-butadien langsam zugetropft und die Reaktionsmischung 6 h bei -25°C gerührt. Das THF wird anschließend abgepumpt bei RT (14 mm Hg/1 h), (0.5 mm/2h) und der Rückstand in 10.5 ml Diethylether gelöst. Die Lösung wird auf -78°C gekühlt und 1.382 g (7.34 mmol, 1 equiv) Aldehyd 42 zugetropft. Man löst 12 h bei -78°C rühren und läßt dann auf RT erwärmen. Die Reaktionsmischung wird mit 10.7 ml 3 N NaOH-Lösung versetzt, danach mit 4.4 ml 30 %iger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung und 2 h unter Rückfluß erhitzt. Die organische Phase wird abgetrennt, mit 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 15 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingedunstet. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Pentan:Ether = 2:1 gereinigt und man erhält 800 mg (3.098 mmol) des Alkohol 43, entsprechend einer Ausbeute von 42 %.

Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses erfolgte durch GC-analytische Untersuchung der diastereomeren Verbindungen, die bei der Veresterung des Alkohols mit (1R)-(-)-Camphorsäurechlorid erhalten werden und ergab einen ee-Wert von 92 %.

Allgemeine Daten:  $\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{Si}$ , FG = 258.47 g/mol

**$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 145.69 (d), 112.27 (t), 78.52 (d), 63.29 (t), 41.19 (s), 33.39 (t), 25.89 (q), 22.85 (q), 22.43 (q), 18.17 (s), -5.52 (q)

**Darstellung von 4-(1,1-Dimethyl-allyl)-2,2-dimethyl-[1,3]dioxan 44**

Es werden 278 mg (1.076 mmol) des Alkohols 43 in 13 ml Aceton gelöst und 200 mg (2.51 mmol, 2.3 equiv) wasserfreies  $\text{CuSO}_4$  zugegeben. Dann werden 40 Tropfen einer Lösung von 0.1 ml Eisessig in 1 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugetropft und 12 h bei RT gerührt. Falls sich DC-chromatographisch noch Edukt nachweisen läßt, wird weitere Säurelösung zugegeben, bis die Umsetzung vollständig ist. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch auf ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gegossen und die wässrige Phase mit DE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Pentan:Ether = 2:1 gereinigt. Man erhält 161 mg (0.87 mmol) des Acetonids 44 entsprechend einer Ausbeute von 81 %.

**Allgemeine Daten:**  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_2$ , FG = 184.28 g/mol

**$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 145.10 (d), 111.88 (t), 98.19 (s), 75.32 (d), 60.10 (t), 39.97 (s), 29.80 (q), 25.88 (t), 22.86 (q), 22.45 (q), 19.11 (q)

**Darstellung von 2-(2,2-Dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)-2-methyl-propionaldehyd 45**

Es werden 286 mg (1.55 mmol) des Acetonids 44 in 18 ml THF gelöst und 14 ml wässriger Phosphatpuffer pH 7 zugegeben. Zu der kräftig gerührten Reaktionsmischung wird 400  $\mu\text{l}$  (0.031 mmol, 0.02 equiv)  $\text{OsO}_4$ -Lösung (2.5 %lg in tert-Butanol) zugetropft. Nach 10 Minuten werden 996 mg (4.656 mmol, 3 equiv)  $\text{NaIO}_4$  portionsweise über einen Zeitraum von 20 Minuten zugegeben. Die Mischung wird kräftig bei RT gerührt und nach 24 und 48 h jeweils weitere 332 mg (je 1.55 mmol, 2x1.0 equiv)  $\text{NaIO}_4$  addiert. Nach 55 h werden die Phasen getrennt, die wässrige Phase mit Ether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Pentan:DE = 1:1 gereinigt. Man erhält 221 mg (1.19 mmol) des Aldehyds 45 entsprechend einer Ausbeute von 76 %.

Allgemeine Daten:  $C_{10}H_{18}O_3$ , FG = 186.25 g/mol.  
 $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ): 206.09 (d), 98.43 (s), 72.94 (d), 59.75 (t), 48.84 (s),  
29.57 (q), 25.57 (t), 18.96 (q), 18.62 (q), 16.46 (q)

**Darstellung von 2-(2,2-Dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)-2-methyl-pentan-3-ol 46**  
Eine Lösung von 263 mg (1.44 mmol) des Aldehyds 45 in 4 ml Diethylether wird bei 0 °C mit 528  $\mu$ l (1.58 mmol, 1.1 equiv) einer 3 M Lösung von EtMgBr in Ether versetzt. Man läßt 2 h bei 0 °C rühren, erwärmt auf RT und läßt eine weitere Stunde rühren. Zur Aufarbeitung wird mit ges. wässriger  $NH_4Cl$ -Lösung versetzt und dann soviel Wasser zugegeben bis der Niederschlag in Lösung geht. Die wässrige Phase wird mit Ether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $MgSO_4$  getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Pentan:Ether = 1:1 gereinigt. Man erhält 251 mg (1.16 mmol) des Alkohols 46, entsprechend einer Ausbeute von 80 %.

Allgemeine Daten:  $C_{12}H_{24}O_3$ , FG = 216.31 g/mol  
 $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $C_6D_6$ ): 98.41 (s), 79.95 (d), 76.65 (d), 60.10 (t), 40.60 (s),  
Diastereomer 1: 30.04 (q), 25.73 (t), 24.64 (t), 20.03 (q), 19.25 (q), 15.99 (q), 11.67 (q)  
 $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $C_6D_6$ ): 98.57 (s), 78.85 (d), 76.46 (d), 60.08 (t), 39.93 (s),  
Diastereomer 2: 30.02 (q), 25.41 (t), 25.08 (t), 20.85 (q), 20.30 (q), 18.90 (q), 11.95 (q)

**Darstellung von 2-(2,2-Dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)-2-methyl-pentan-3-on 2:**  
W.P. Griffith, S.V. Ley, G.P. Whitcombe, A.D. White, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1987, 1625-1627

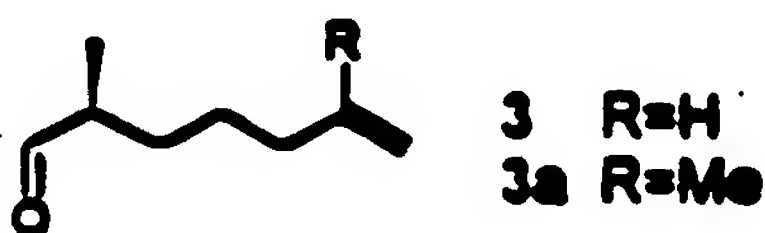
Es werden 70 mg (0.32 mmol) des Alkohols 46 in 5 ml  $CH_2Cl_2$  gelöst und 6 4 Å Molekelsiebkugeln und 66 mg (0.48 mmol, 1.5 equiv) 4-Methylmorpholin N-oxid (NMO) zugegeben. Nach 10 Minuten Rühren werden 6 mg Tetrapropylammonium-permuthenoat(VII) (TPAP) (0.016 mmol, 0.05 equiv) addiert und 4 h bei RT gerührt. Danach wird die Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer eingengt und direkt säulenchromatographisch mit Pentan:Ether = 1:1 gereinigt. Man erhält 60 mg (0.28 mmol) des Ethylketons 2, entsprechend einer Ausbeute von 86 %.



Allgemeine Daten:  $C_{12}H_{22}O_3$ , FG = 214.30 g/mol

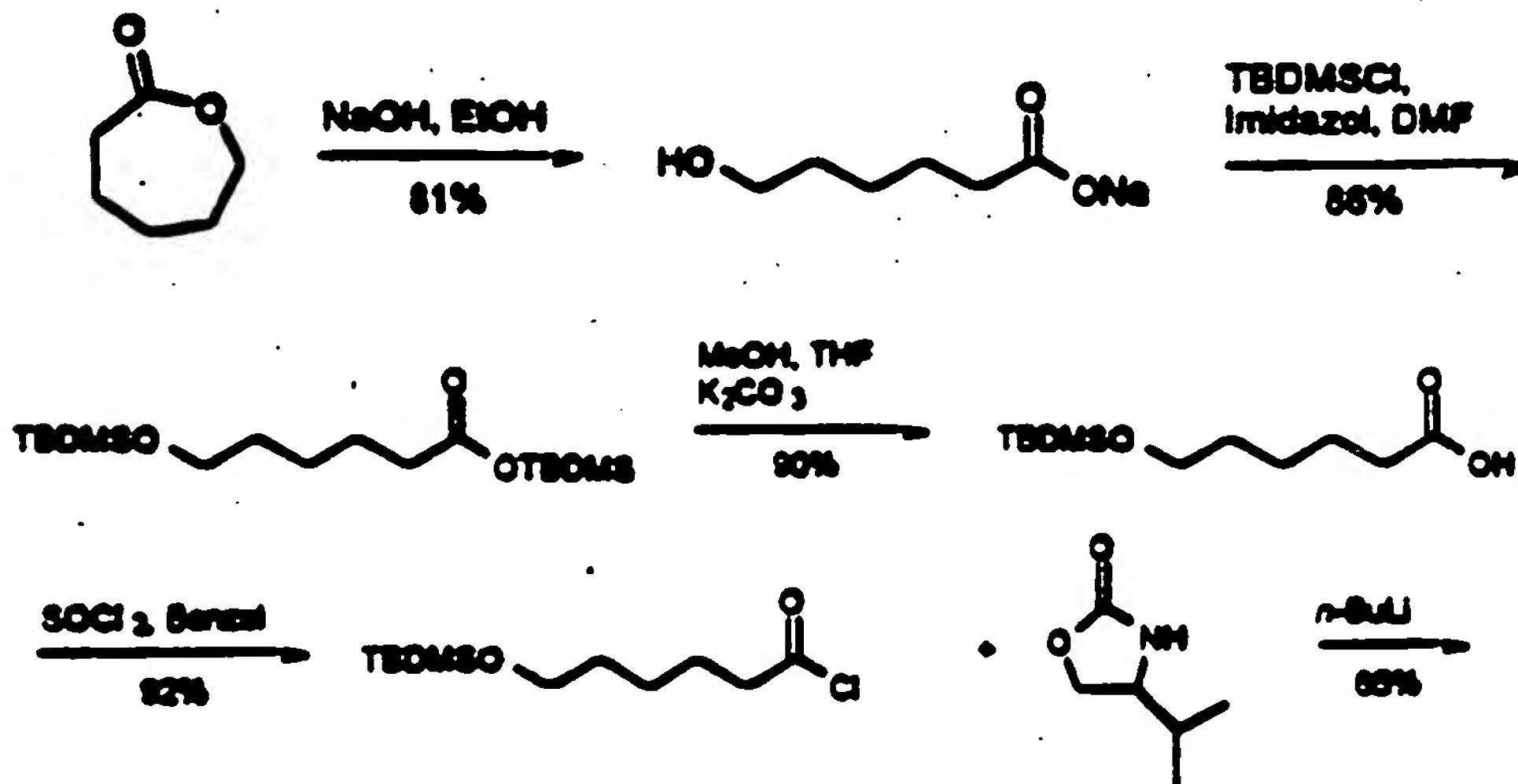
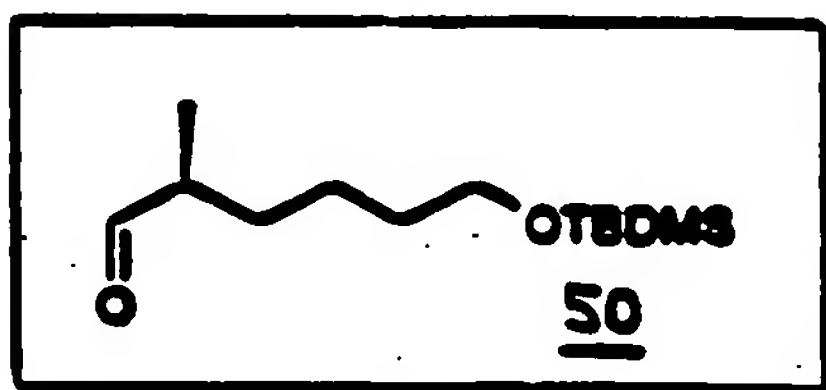
$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $C_6D_6$ ): 213.23 (s), 98.42 (s), 74.18 (d), 59.82 (t), 50.44 (s), 31.70 (t), 30.03 (q), 25.55 (t), 20.97 (q), 19.35 (q), 19.04 (q), 8.16 (q)

Synthese von 2-Methyl-6-heptenal **3** und **3a**

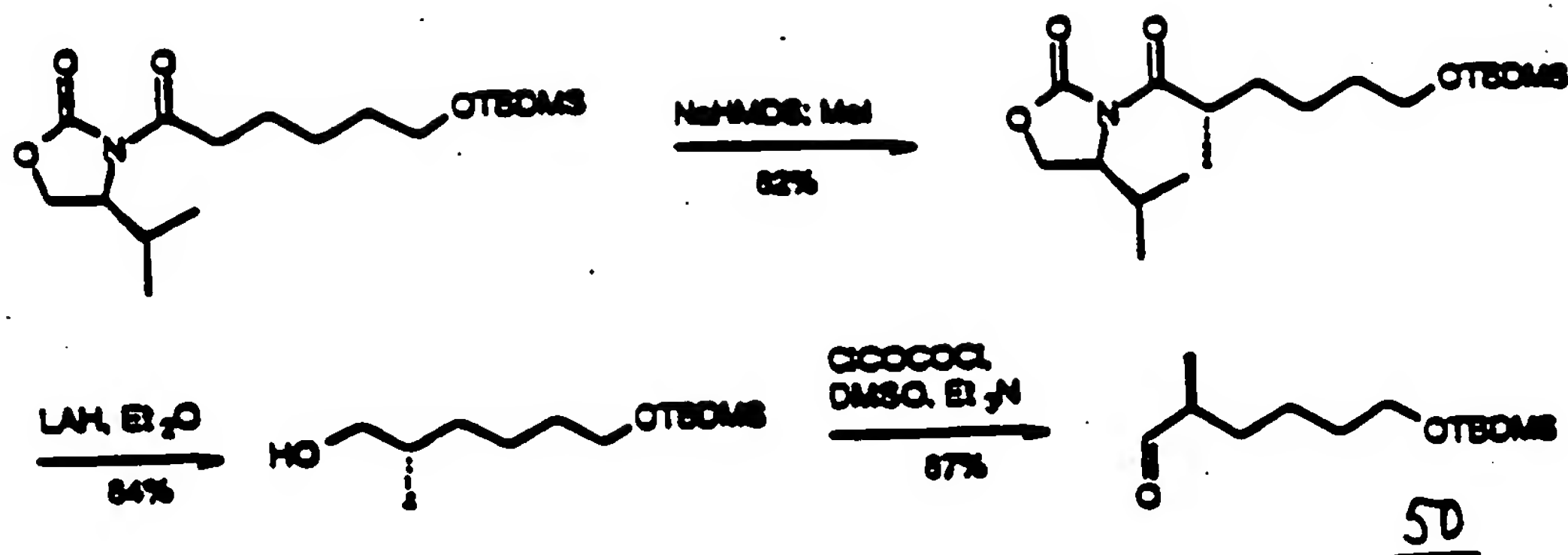


Die Herstellung erfolgt in Anlehnung zur Synthese von 6-tert.-

Butyldimethylsilyloxy-2-methyl-hexanal **50** [D. Schinzer, A. Limberg, O. M. Böhm, *Chem. Eur. J.* 1996, 2, 1477].



16



### Arbeitsvorschriften zur Darstellung von Segment 3:

Das Natrium-6-hydroxyhexanoat wird nach einer Vorschrift von Wulff, Krüger und Röhle *Chem. Ber.* 1971, 104, 1387-1399 aus  $\omega$ -Caprolacton hergestellt.

**Darstellung von 6-[(tert-Butyldimethylsilyl)oxy]-hexansäuresilylester**  
 Eine Mischung aus 2.00 g (12.97 mmol) des Natrium-6-hydroxyhexanoats, 25 ml DMF, 5.87 g (38.93 mmol, 3 equiv) TBDMSCl und 5.3 g (77.85 mmol, 6 equiv) Imidazol wird 48 Stunden bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird flashfiltriert und anschließend mit Pentan:DE = 4:1 säulen-chromatographisch gereinigt. Man erhält 3.99 g (11.1 mmol) der bissilylierten Verbindung 6-[(tert-Butyldimethylsilyl)oxy]-hexansäuresilylester, entsprechend einer Ausbeute von 85 %.

Allgemeine Daten:  $\text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{Si}_2$ , FG = 360.69 g/mol  
 $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 174.17 (s), 63.00 (t), 38.02 (t), 32.53 (t), 25.95 (q), 25.55 (q), 25.40 (t), 24.91 (t), 18.33 (s), 17.57 (s), -4.83 (q), -5.32 (q)

**Darstellung von 6-[(tert-Butyldimethylsilyl)oxy]-hexansäure**  
 nach D.R. Morton, J.L. Thompson, *J. Org. Chem.* 1978, 43, 2102-2108.  
 Eine Lösung von 3.25 g (9.02 mmol) der bissilylierten Verbindung 6-[(tert-Butyldimethylsilyl)oxy]-hexansäuresilylester in 130 ml Methanol und 44 ml THF wird mit einer Lösung von 4.4 g (31.8 mmol, 3.5 equiv)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in 44 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und 1 h bei RT gerührt. Danach wird das Volumen der Reaktionslösung im Vakuum auf ein Viertel reduziert. Man verdünnt mit 130 ml ges. NaCl-Lösung und stellt mit 1 M  $\text{KHSO}_4$ -Lösung auf pH 4-5 ein. Es wird mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Man erhält 2.01 g (8.17 mmol) von 6-[(tert-Butyldimethylsilyl)oxy]-hexansäure, entsprechend einer Ausbeute von 90 %.

Allgemeine Daten:  $C_{12}H_{26}O_3Si$ , FG = 246.42 g/mol

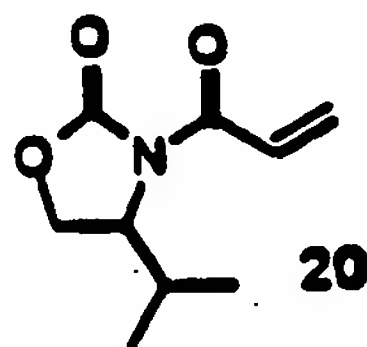
$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ): 180.09 (s), 62.90 (t), 34.05 (t), 32.37 (t), 25.93 (q), 25.31 (t), 24.46 (t), 18.32 (s), -5.33 (q)

### Darstellung von 6-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-hexanoylchlorid

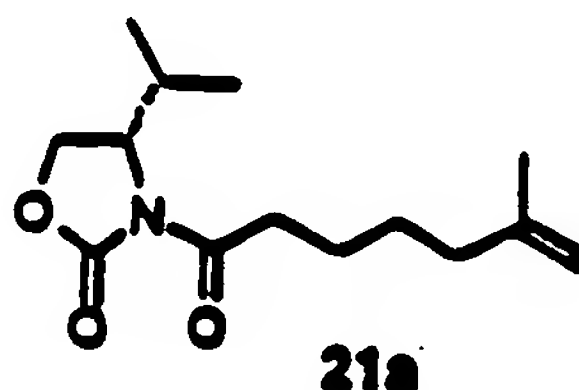
J. Tanaka, *Bull. Chem. Jpn.* 1992, 65, 2851-2853.

Eine Lösung von 0.5 g (2.03 mmol) 6-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-hexansäure in 4 ml Benzol wird mit 362 mg (3.04 mmol, 1.5 equiv)  $SOCl_2$  versetzt und 2 h unter Rückfluß erhitzt. Man läßt abkühlen und destilliert das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab. Um das überschüssige  $SOCl_2$  aus der Reaktionsmischung zu entfernen, wird der Rückstand wieder mit Benzol versetzt und erneut abdestilliert. Man erhält 494 mg (1.865 mmol, 92%) des 6-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-hexanoylchlorids. Dieses Rohprodukt wird ohne Aufreinigung und Charakterisierung weiter umgesetzt.

### \*(*S*)-4-Isopropyl-3-propenoyl-oxazolidin-2-on **20**



Darstellung in Anlehnung an: D. A. Evans, K. T. Chapman, J. Bisha *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 1238; A. Studer, T. Hintermann, D. Seebach *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 1185. Zu einer Lösung von 1.299 g (10.0 mmol) (*S*)-4-Isopropyl-oxazolidin-2-on in 15 ml absolutem THF werden bei -78 °C langsam 6.88 ml einer 1.6M Lösung von *n*-BuLi in Hexan (11.0 mmol) gegeben. Man rührt die Lösung 30 min bei -78 °C, gibt tropfenweise 1.22 ml (15.0 mmol) Acrylsäurechlorid hinzu, läßt auf Raumtemperatur kommen und hydrolysiert mit 50 ml gesättigter  $NH_4Cl$ -Lösung. Es wird dreimal mit je 50 ml  $Et_2O$  extrahiert. Nach dem Trocknen über  $MgSO_4$  wird das Lösungsmittel entfernt. Durch Flash-chromatographische Reinigung mit Pentan/ $Et_2O$  (10:1) erhält man 1.63 g (8.9 mmol, 89%) **20**.

**(S)-4-Isopropyl-3-(6-methylhept-6-enoyl)-oxazolidin-2-on 21a**

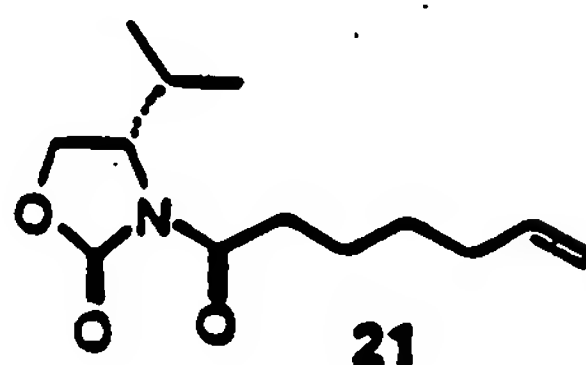
Darstellung in Anlehnung an:

A. Studer, T. Hintermann, D. Seebach *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 1185  
47 mg (1.9 mmol) Mg-Drehspäne werden bei Raumtemperatur (bzw. unter gelegentlichem Erwärmen) in 1,5 ml absolutem THF mit 283 mg (1.9 mmol) 4-Brom-2-methyl-1-buten gerührt, bis alles Mg in Lösung gegangen ist. Diese Grignard-Lösung wird bei -30 °C mit einer Suspension von 197 mg (1.00 mmol) CuBr·Me<sub>2</sub>S in 1,5 ml absolutem THF versetzt. Man rührt 30 min bei dieser Temperatur, gibt 117 mg (0.64 mmol) **20** in 2 ml absolutem THF hinzu, rührt 18 h bei -10 °C und hydrolysiert mit 10 ml gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung. Es wird dreimal mit je 20 ml Et<sub>2</sub>O extrahiert. Nach dem Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel entfernt. Durch Flash-chromatographische Reinigung mit Pentan/Et<sub>2</sub>O (15:1) erhält man 128 mg (0.51 mmol, 79%) **21a**.

**Hept-6-enoylchlorid**

Eine Lösung von 2.58 g (20.13 mmol) Hept-6-ensäure in 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wird mit 5.11 g (40.26 mmol, 2 eq.) Oxalylchlorid versetzt, dann 1 h bei RT und 1 h bei 40 °C gerührt. Man lässt abkühlen und destilliert das Lösungsmittel bei 5 mbar ab. Man erhält 2.95 g (20.13 mmol, 100%) des Säurechlorids. Dieses Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

Allgemeine Daten: C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>ClO, FG = 146.62 g/mol

**(S)-3-Hept-6-en yl-4-is propyl-oxazolidin-2-on 21**

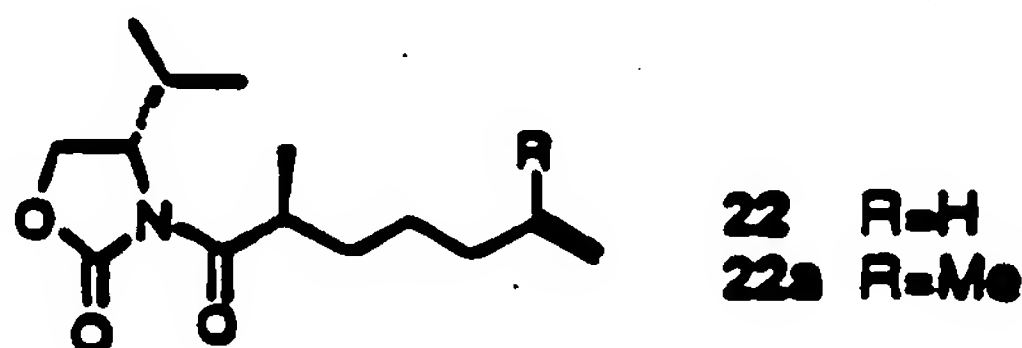
A. Gonzalez, *Synth. Comm.* 1991, 21, 1353-1360.

Eine Lösung von 2.08 g (16.10 mmol, 1 eq.) (4S)-4-Isopropyl-oxazolidin-2-on in 15 ml THF wird auf -78 °C gekühlt und tropfenweise mit 11.6 ml (18.52 mmol, 1.15 eq.) einer 1.6 M Lösung von n-BuLi-Lösung in Hexan versetzt. Anschließend wird bei -78 °C eine Lösung von 2.95 g (20.13 mmol, 1.25 eq.) Hept-6-enoylchlorid in 10 ml THF zugegeben. Man läßt auf RT erwärmen und gießt die Reaktionslösung auf gesättigte NaCl-Lösung. Die wäßrige Phase wird mit Ether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird säulen-chromatographisch mit PE : DE = 3 : 1 gereinigt. Man erhält 3.55 g (14.82 mmol, 92%) des Oxazolidinons **21** als farbloses Öl.

Allgemeine Daten: C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub> , FG = 239.31 g/mol

**(4S, 2'S)-4-Isopropyl-3-(2-methyl-hept-6-enoyl)-oxazolidin-2-on 22**  
analog Darst. 25 und

**(4S, 2'S)-4-Isopropyl-3-(2,6-dimethylhept-6-enoyl)-oxazolidin-2-on 22a**



D.A. Evans, A.E. Weber *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 6757-6761.

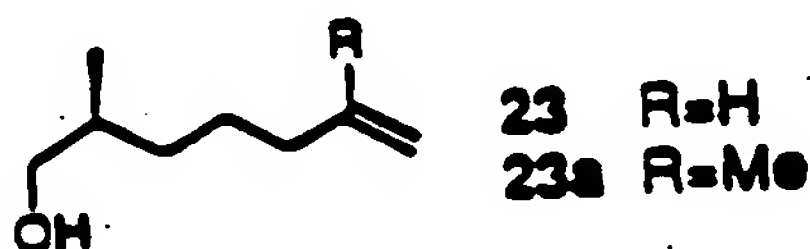
Es werden 9.02 ml (9.02 mmol, 1.15 equiv) einer 1 M Lösung von NaHMDS in THF auf -78°C gekühlt und tropfenweise mit einer auf 0°C gekühlten Lösung von 1.88 g (7.84 mmol) Oxazolidinon **21** in 8 ml THF versetzt. Man läßt 1 h bei -78°C rühren, addiert 5.57 g (39.22 mmol, 5 equiv) MeI gelöst in 2 ml THF und läßt für 4 h bei -78°C rühren. Anschließend wird mit ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gequenchet, mit Diethylether

extrahiert, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit PE : DE = 4 : 1 gereinigt. Man erhält 1.51 g (5.96 mmol, 76%) der methylierten Verbindung **22**.

Allgemeine Daten:  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ , FG = 253.34 g/mol

Verbindung **22a** wird analog hergestellt. Aus 2.03 g (8.0 mmol) **21a** erhält man 1.56 g (5.84 mmol, 73%) **22a**.

(S)-2-Methyl-hept-6-en-1-ol **23** und  
(S)-2,6-Dimethylhept-6-en-1-ol **23a**



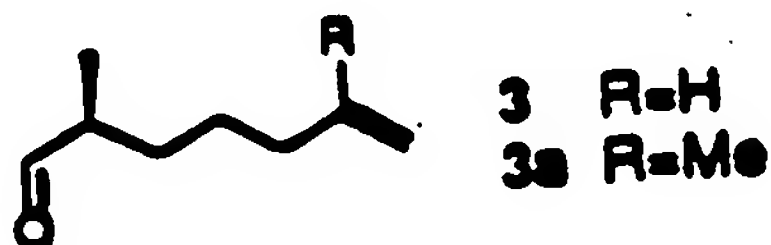
D.A. Evans, A.E. Weber *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 108, 6757-6761

Zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 738 mg (2.91 mmol) der methylierten Verbindung **22** in 10 ml Diethylether werden langsam 5.83 ml (5.83 mmol, 2 eq.) einer 1 M Suspension von LAH in Diethylether zugegeben. Es wird gequenchet durch die Zugabe von 221 ml Wasser, 221 ml 15%iger wässriger NaOH-Lösung und 663 ml Wasser. Anschließend wird über Celite mit Diethylether flashfiltriert und säulenchromatographisch mit Pentan : DE = 3 : 1 gereinigt. Man erhält 299 mg (2.33 mmol, 80%) des Alkohols **23** als farblose Flüssigkeit.

Allgemeine Daten:  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}$ , FG = 128.21 g/mol

Verbindung **23a** wird analog hergestellt. Aus 748 mg (2.80 mmol) **22a** erhält man 331 mg (2.32 mmol, 83%) **23a**.

(S)-2-Methyl-hept-6-enal **3** und (S)-2,6-Dimethylhept-6-enal **3a**



Eine Lösung von 295 mg Alkohol **23** (2.30 mmol) in 5 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wird mit 1.269 g (2.99 mmol, 1.3 eq.) Dess-Martin-Periodinan (1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-on) versetzt und 25 Minuten bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird ein Volumenequivalent Phosphatpuffer pH 7 zugegeben. Die wässrige Phase wird mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$

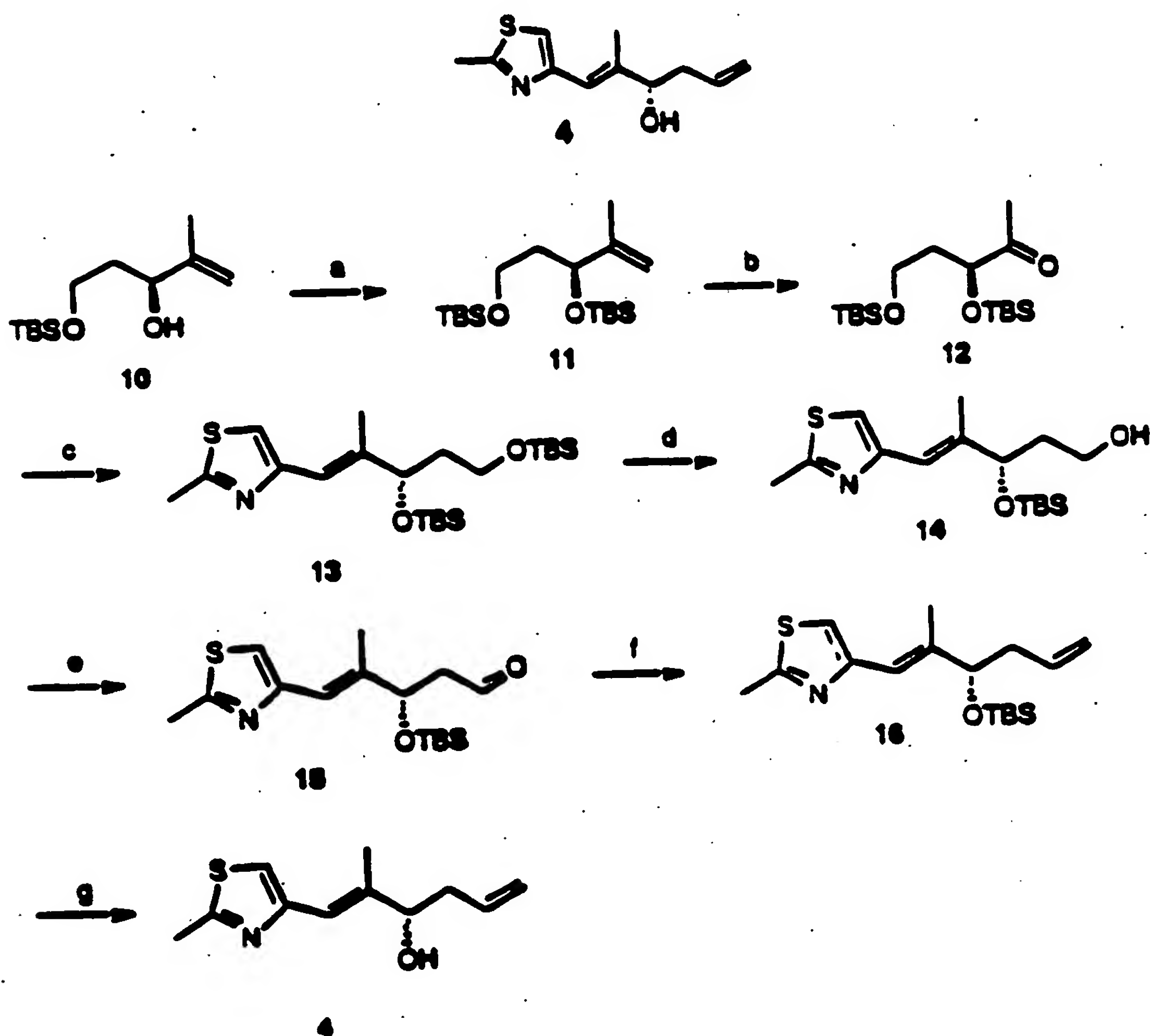


getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird säulen-chromatographisch mit Pentan : DE = 10 : 1 gereinigt. Man erhält 224 mg (1.77 mmol, 77%) des Aldehyds als farblose Flüssigkeit.

Allgemeine Daten:  $C_8H_{14}O$ , FG = 126.20 g/mol

Verbindung **3a** wird analog hergestellt. Aus 284 mg (2.00 mmol) **23a** erhält man 199 mg (1.42 mmol, 71%) **3a**.

#### Herstellung von **4**:





**Synthese von Segment 4:****3-[(t-Butyldimethylsilyl)oxy]-propanal**

Synthese durch Monosilylierung von 1,3-Propandiol und anschließende Swern-Oxidation des entstandenen 3-[(t-Butyldimethylsilyl)oxy]-1-propanols.

Allgemeine Daten:  $C_9H_{20}O_2Si$ ; FG=188.36; CAS-Nr. [89922-82-7]

$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ =202.05 (d), 57.42 (t), 46.58 (t), 25.82 (q), 18.23 (s), -5.43 (q)

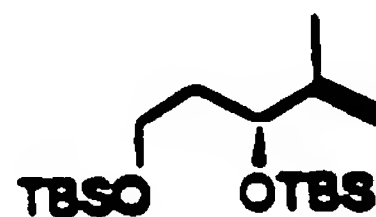
**1-[(t-Butyldimethylsilyl)oxy]-3-hydroxy-4-methyl-4-penten 10**

Zu 443 mg Mg-Drehspänen (18.2 mmol) und 1.5 ml abs. THF unter  $N_2$  werden 0.2 ml 2-Brompropen gegeben, so daß die Reaktion anspringt. Es wird unter gelegentlicher Kühlung eine Lösung von 1.7 ml 2-Brompropen (insgesamt 22 mmol) in 6 ml abs. THF langsam zugetropft, bis alle Mg-Späne gelöst sind. Zu der noch warmen Mischung wird eine Lösung von 2.862 g 1 (15.2 mmol) in 6 ml abs. THF getropft. Es wird 6 h bei RT gerührt. Danach gibt man 25 ml ges.  $NH_4Cl$ -Lsg. zu der Reaktionslösung und läßt 10 Min. rühren. Die Mischung wird in 30 ml ges.  $NH_4Cl$ -Lsg. gegossen und zweimal mit Ether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden je einmal mit ges.  $NH_4Cl$ -Lsg. und ges.  $NaCl$ -Lsg. gewaschen. Man trocknet über  $MgSO_4$ , engt im Vakuum ein und reinigt flashchromatographisch (Ether:Pentan = 1:6).

Man erhält 2.749 g 2 (11.9 mmol; 79% d. Th.) als farbloses Öl.

Allgemeine Daten:  $C_{12}H_{26}O_2Si$ ; FG=230.43

$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ =147.10 (s), 110.39 (t), 75.21 (d), 62.17 (t), 38.79 (t), 25.89 (q), 18.41 (s), -5.49 (q), -5.53 (q)

**(S)-1,3-Di-[(tert-Butyldimethylsilyl oxy)]-4-methyl-4-penten 11****11**

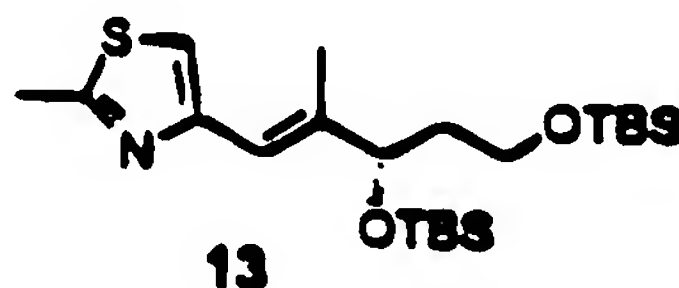
Zu einer Lösung von 1,173 g (4.83 mmol) (S)-1-[(tert-Butyldimethylsilyloxy)]-4-methyl-4-penten-3-ol 10 und 855 mg (12.56 mmol, 2.6 eq) Imidazol in 15,0 ml absolutem DMF werden 946 mg (6.28 mmol, 1.3 eq) tert-Butyldimethylchlorsilan gegeben. Die Mischung wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Man versetzt mit 50 ml einer wäßrigen 1M KHSO<sub>4</sub>-Lösung und extrahiert viermal mit je 50 ml Et<sub>2</sub>O. Die vereinigten Etherextrakte werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand durch eine Kieselgel-Säule mit Pentan/Et<sub>2</sub>O (20:1) flash-chromatographiert. Alternativ zu dieser wäßrigen Aufarbeitung kann die Reaktionsmischung unmittelbar chromatographiert werden. Nach beiden Aufarbeitungsvarianten erhält man 1,643 g (4.73 mmol, 98%) 11.

**(S)-3,5-Di-[(tert-Butyldimethylsilyloxy)]-pentan-2-on 12****12**

Ozon in O<sub>2</sub> wird bei -78 °C durch eine Lösung von 1,610 g (4.67 mmol) 11 in 200 ml absolutem Dichlormethan geleitet (Trockeneis/Aceton-Kältebad). Wenn dünnschicht-chromatographisch in der Lösung Ausgangsverbindung 11 nicht mehr nachzuweisen ist, werden 3,89 g (14.83 mmol) Triphenylphosphin hinzugefügt, und das Kältebad wird entfernt. Man läßt den Reaktionsansatz langsam auf Raumtemperatur kommen und destilliert das Lösungsmittel im Vakuum ab. Flash-Chromatographie des Rückstandes durch eine Kieselgel-Säule mit Pentan/ Et<sub>2</sub>O (50:1) liefert 1,135 g (3.27 mmol, 70%) 12.

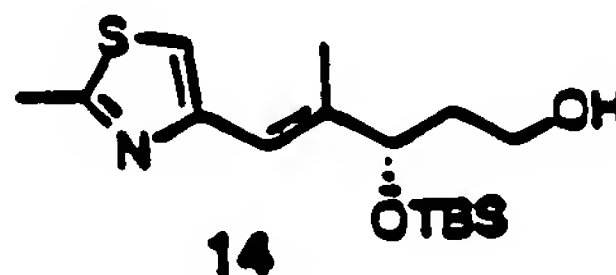
**Diethyl-(2-methylthiazol-4-yl)-methanphosphonat**

Die Herstellung erfolgt ausgehend vom literaturbekannten 4-Chlormethyl-2-methylthiazol analog der Vorschrift für 4-Brommethyl-2-methylthiazol. Aus 7,381 g (50 mmol) 4-Chlor-methyl-2-methylthiazol erhält man 9,971 g (40 mmol, 80%) Diethyl-(2-methylthiazol-4-yl)-methanphosphonat.

**(S,4E)-4-[3,5-Di-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-2-methyl-pent-1-enyl]-2-methylthiazol 13**

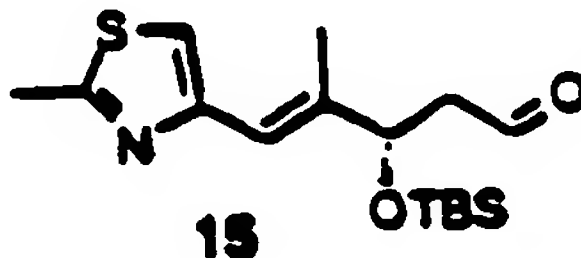
Zu einer Lösung von 1,170 g (4.70 mmol) Diethyl-(2-methylthiazol-4-yl)-methanphosphonat in 15 ml absolutem THF werden bei -78 °C 2,94 ml *n*-BuLi (1,6 m Lösung in Hexan) getropft. Man läßt 45 min bei -78 °C rühren und tropft dann langsam eine Lösung von 1,135 g (3.27 mmol) 12 in 10 ml absolutem THF zu, läßt auf Raumtemperatur erwärmen und rührt noch 12 h bei Raumtemperatur. Die Reaktionsmischung wird mit 100 ml gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung versetzt und viermal mit je 80 ml Et<sub>2</sub>O extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand durch eine Kieselgel-Säule mit Pentan/ Dichlormethan (2:3) flash-chromatographiert. Man erhält 1,090 g (2.47 mmol, 75%) 13.

(S,4E)-3-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-4-methyl-5-(2-methylthiazol-4-yl)-pent-4-en-1-ol **14**



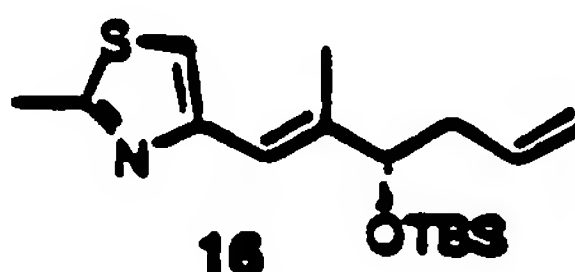
Eine Lösung von 442 mg (1.0 mmol) **13** in 40 ml Acetonitril wird bei -20 °C tropfenweise mit 0,45 ml Fluorwasserstoffsäure (40 %) versetzt. Nach Zugabe von einigen Glassplittern bzw. 0,045 ml Hexafluorokieselsäure (30 %) rührt man bei 0 °C, bis dünnschichtchromatographisch in der Lösung Ausgangsverbindung **13** nicht mehr nachzuweisen ist. Die Reaktionsmischung wird mit 50 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und viermal mit je 80 ml Et<sub>2</sub>O extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand durch eine Kieselgel-Säule mit Et<sub>2</sub>O flash-chromatographiert. Man erhält 284 mg (0.87 mmol, 87%) **14**.

(S,4E)-3-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-4-methyl-5-(2-methylthiazol-4-yl)-pent-4-enal **15**



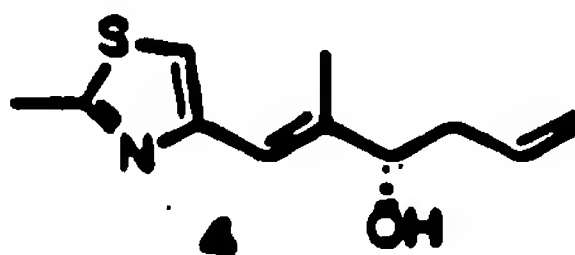
Eine Suspension von 478 mg (1.127 mmol, 1.3 eq) Dess-Martin-Periodinan (1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-on) in 5,6 ml absolutem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wird mit einer Lösung von 284 mg (0.87 mmol) **14** in 5.0 ml absolutem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt und 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand durch eine Kieselgel-Säule mit Pentan/Et<sub>2</sub>O (4:1) flash-chromatographiert. Man erhält 222 mg (0.68 mmol, 78%) **15**.

**(S,4E)-4-[3-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-2-methyl-hexa-1,5-dienyl]-2-methyl-thiazol 16**



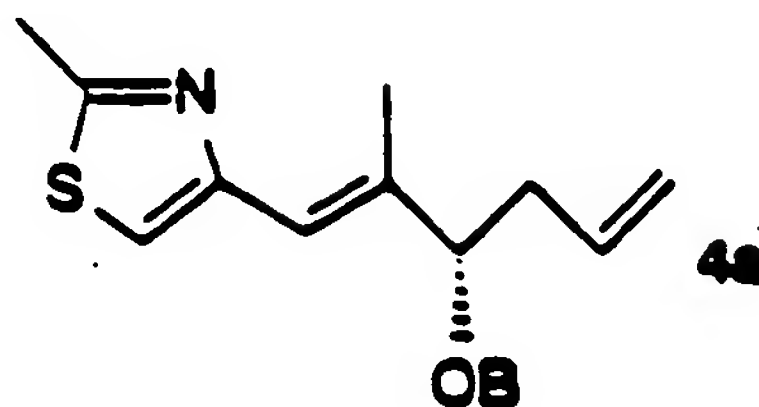
440 mg (1.06 mmol, 1.55 eq) einer Mischung äquimolarer Mengen von Natriumamid und Methyltriphenylphosphoniumbromid werden 30 min bei Raumtemperatur in 4,0 ml absolutem THF gerührt. Man fügt eine Lösung von 185 mg (0.57 mmol) 15 in 5,0 ml absolutem THF hinzu, rührt noch 20 min, versetzt mit 20 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und extrahiert viermal mit je 30 ml Et<sub>2</sub>O. Die vereinigten Etherextrakte werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand durch eine Kieselgel-Säule mit Pentan/Et<sub>2</sub>O (20:1) flash-chromatographiert. Man erhält 151 mg (0.47 mmol, 83%) 16.

**2-Methyl-1-(2-methyl-thiazol-4-yl)-hexa-1,5-dien-3-ol 4**

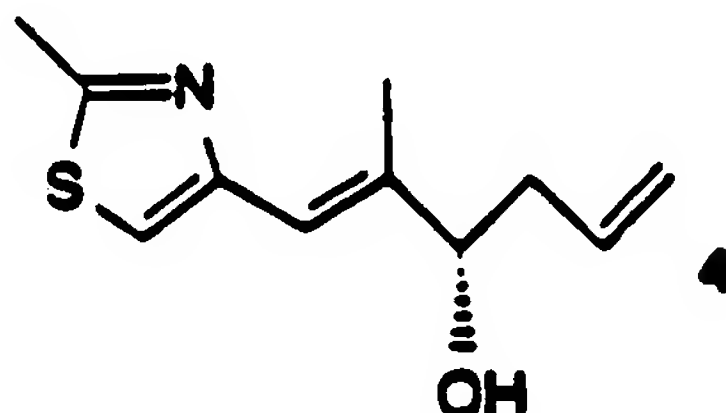


1,18 ml (1.18 mmol, 2.5 eq) einer 1M TBAF-Lösung in THF werden in 10 ml absolutem THF 20 min mit aktiviertem Molsieb 4Å bei Raumtemperatur gerührt, um restliches Wasser der TBAF-Lösung zu binden. Zu der resultierenden wasserfreien TBAF-Lösung wird bei -78 °C tropfenweise eine Lösung von 151 mg (0.47 mmol) 16 gegeben. Man läßt langsam unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmen und hydrolysiert mit 50 ml gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung, wenn dünnschichtchromatographisch in der Lösung Ausgangsverbindung 16 nicht mehr nachzuweisen ist. Es wird dreimal mit je 50 ml Et<sub>2</sub>O extrahiert. Nach dem Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel entfernt. Durch Flash-chromatographische Reinigung mit Pentan/Et<sub>2</sub>O (20:1) erhält man 97 mg (0.465 mmol, 99%) 4.

Die Darstellungen von Verbindungen der allgemeinen Formel 4a

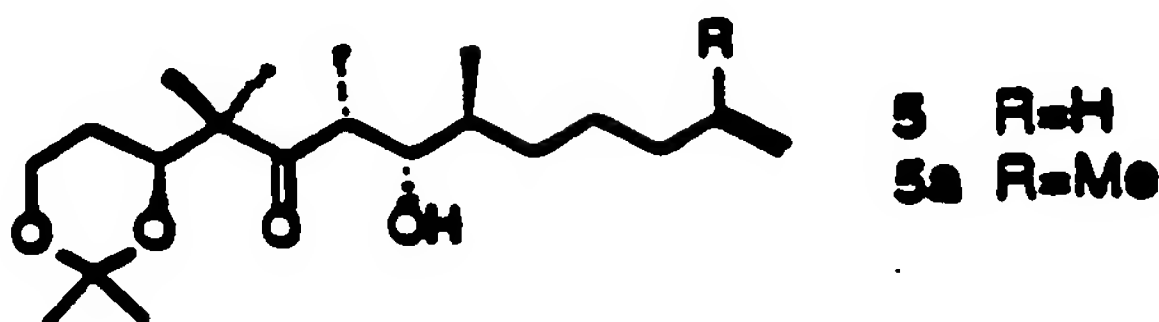


(B steht für Benzyl-, p-Methoxybenzyl-, Tetrahydropyranyl- oder eine Silylschutzgruppe; z. B. Trialkyl- oder Diaryl-alkyl-silylschutzgruppen, insbesondere tert.-Butyl-dimethyl-, Trimethylsilyl- und Diphenyl-tert.-butyl-silylgruppen) erfolgt aus



durch Anwendung konventioneller Schutzgruppentechnik der Veretherung, siehe auch (D. Schinzer, A. Limberg, O. M. Böhm, *Chem. Eur. J.* 1996, 2, 1477).

Darstellung von 5 und Verbindungen der allgemeinen Formel 9a  
(4'S,4R,5S,6S)-2-(2,2-Dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)-5-hydroxy-2,4,6-trimethyl-undec-10-en-3-on **5** und  
(4'S,4R,5S,6S)-2-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)-5-hydroxy-2,4,6,10-tetramethyl-undec-10-en-3-on **5a**  
analog Schema 2.



C. H. Heathcock, C. T. Buse, W. A. Kleschick, M. C. Pirmung, J. E. Sohn, J. Lampe  
*J. Org. Chem.* 1980, 45, 1066

Zu einer Lösung von 153 mg (1.509 mmol, 0.98 eq.) in 1.5 ml THF werden bei 0°C  
943 Mikroliter (1.509 mmol, 0.98 eq.) einer 1.6 M Lösung von n-BuLi in Hexan

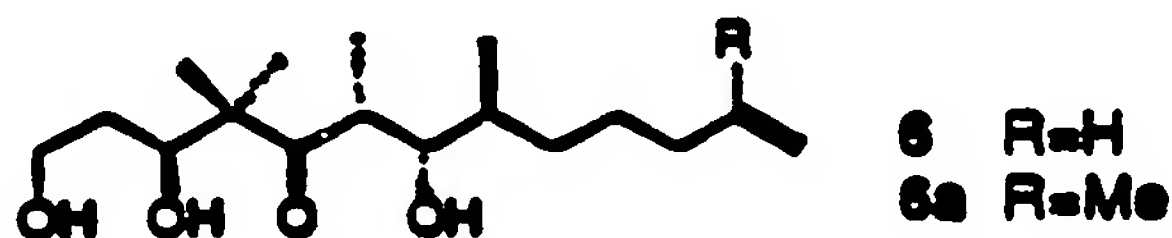


getropft und 30 Minuten gerührt, bevor dann auf  $-78^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt wird. Nun werden 330 mg (1.540 mmol, 1 eq.) (S)-2-(2,2-Dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)-2-methyl-pentan-3-on **2**, gelöst in 1 ml THF langsam zugetropft. Die Lösung wird 1 h bei  $-78^{\circ}\text{C}$  gerührt. Anschließend werden 194 mg (1.540 mmol, 1 eq.) (S)-2-Methyl-hept-6-enal **3** zugetropft und 45 Minuten bei  $-78^{\circ}\text{C}$  gerührt. Die Reaktionslösung wird durch Zugabe von gesättigter  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gequenchet und auf RT erwärmt. Die wäßrige Phase wird mit Ether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Pentan : Diethylether = 3 : 1 gereinigt. Man erhält 369 mg (1.084 mmol, 70%) des Aldolprodukts **5** als farbloses Öl.

Allgemeine Daten:  $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_4$ , FG = 340.50 g/mol

Verbindung **5a** wird analog hergestellt. Aus 238 mg (1.70 mmol) **3a** erhält man 386 mg (1.09 mmol, 64%) **5a**.

(3S, 6R, 7S, 8S)-1,3,7-Trihydroxy-4,4,6,8-tetramethyl-tridec-12-en-5-on **5**  
und (3S, 6R, 7S, 8S)-1,3,7-Trihydroxy-4,4,6,8,12-pentamethyl-tridec-12-en-5-on **5a**



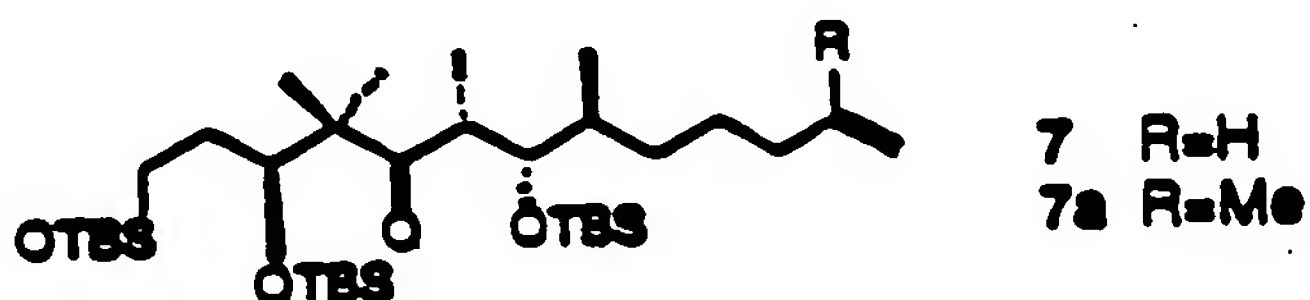
L. A. Paquette, D. R. Sauer, D. G. Cleary, M. A. Kinsella, C. M. Blackwell, L. G. Anderson *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 7375-7387. Eine Lösung von 100 mg (0.294 mmol) des Aldolprodukts **5** in 14 ml MeOH wird mit 95 mg (0.378 mmol, 1.3 eq.) PPTS versetzt, 36 h bei RT gerührt und dann durch die Zugabe von 33 Tropfen gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gequenchet. Die Mischung wird am Rotationsverdampfer eingedunstet und der Rückstand in Ether aufgenommen. Es wird mit gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen und die wäßrige Phase mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Diethylether gereinigt. Man erhält 78 mg (0.260 mmol, 88%) des Triols **6** als farbloses Öl.



Allgemeine Daten:  $C_{17}H_{32}O_4$ , FG = 300.44 g/mol

Verbindung **6a** wird analog hergestellt. Aus 98 mg (0.270 mmol) **5a** erhält man 77 mg (0.46 mmol, 91%) **6a**.

(3S, 6R, 7S, 8S)-1,3,7-Tri-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-4,4,6,8-tetramethyl-tridec-12-en-5-on **7** und (3S, 6R, 7S, 8S)-1,3,7-Tri-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-4,4,6,8,12-pentamethyl-tridec-12-en-5-on **7a**



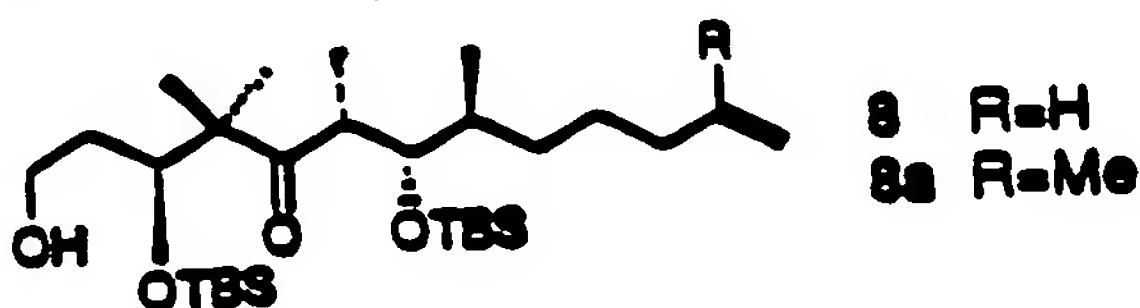
Yuanwei Chen, Pierre Vogel, *J. Org. Chem.* 1994, 59, 2487-2496

Zu einer auf -78°C gekühlten Lösung von 225 mg (0.749 mmol) des Triols **6** in 13 ml  $CH_2Cl_2$  werden langsam 963 mg (8.99 mmol, 12 eq.) 2,6-Lutidin und 1188 mg (4.49 mmol, 6 eq.) *tert*-Butyldimethylsilyltrifluormethansulfonat zugetropft. Man läßt 30 Minuten bei -78°C und 3 h bei 0°C rühren und quencht mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung. Die wäßrige Phase wird mit  $CH_2Cl_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Pentan : Diethylether = 30 : 1 gereinigt. Man erhält 462 mg (0.719 mmol, 96%) des trisilylierten Produkts **7** als farbloses Öl.

Allgemeine Daten:  $C_{35}H_{74}O_4Si_3$ , FG = 643.22 g/mol

Verbindung **7a** wird analog hergestellt. Aus 204 mg (0.650 mmol) **6a** erhält man 423 mg (0.644 mmol, 99%) **7a**.

(3S, 6R, 7S, 8S)-3,7-DI-(*tert*-Butyldimethylsilyl xy)-1-hydroxy-4,4,6,8-tetramethyl-tridec-12-en-5-on **8** und (3S, 6R, 7S, 8S)-3,7-DI-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1-hydroxy-4,4,6,8,12-penta-methyl-tridec-12-en-5-on **8a**

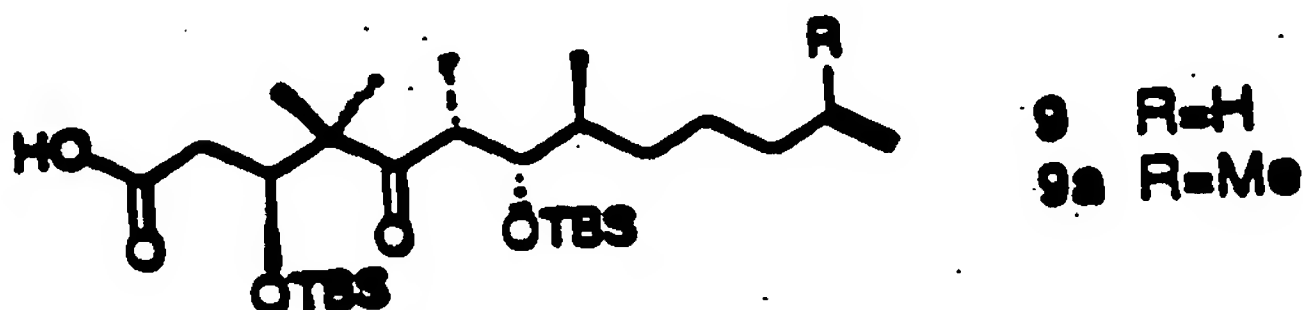


K. C. Nicolaou, K. R. Reddy, G. Skokotas, F. Sato, X.-Y. Xiao  
*J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 7935. Eine Lösung von 156 mg (0.243 mmol) der trisilylierten Verbindung **Z** in 6.5 ml MeOH und 6.5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wird auf 0°C gekühlt und es werden 11 mg Camphersulfonsäure (0.0485 mmol, 0.2 eq.) addiert. Nach 5 h Rühren bei 0°C wird durch die Zugabe von gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gequenchet. Die wäßrige Phase wird mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer destilliert. Der Rückstand wird säulenchromatographisch mit Pentan : Diethylether = 3 : 1 gereinigt. Man erhält 105 mg (0.199 mmol, 82%) des Alkohols **8** als farbloses Öl.

Allgemeine Daten: C<sub>29</sub>H<sub>60</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>, FG = 528.96 g/mol

Verbindung **8a** wird analog hergestellt. Aus 152 mg (0.232 mmol) **Za** erhält man 101 mg (0.186 mmol, 80%) **8a**.

(3S,6R,7S,8S)-3,7-DI-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-4,4,6,8-tetramethyl-5-oxo-tridec-12-ensäure **9** und (3S,6R,7S,8S)-3,7-DI-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-4,4,6,8,12-pentamethyl-5-oxo-tridec-12-ensäure **9a**

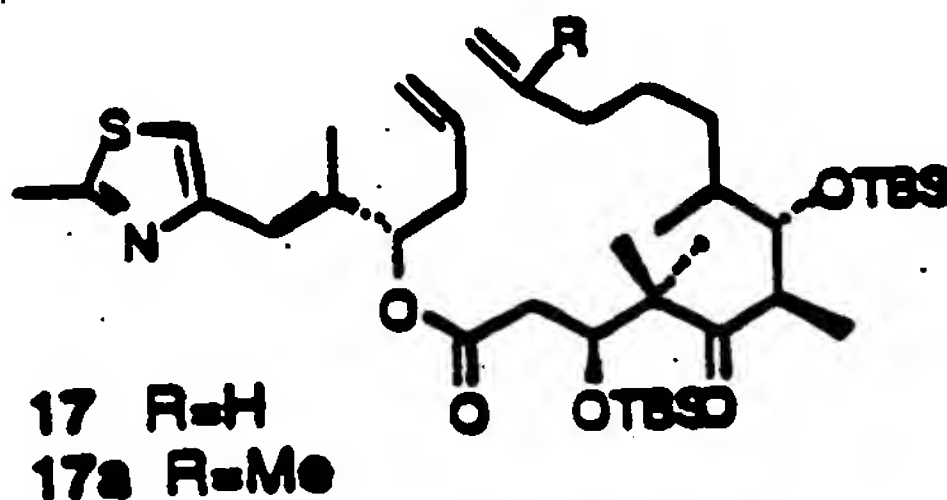


E. J. Corey, G. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* 1979, 399-402

Zu einer Lösung von 303 mg (0.573 mmol) Alkohol **8** in 6 ml DMF werden bei 0°C 2371 mg (6.30 mmol, 11 eq.) PDC gelöst in 3 ml DMF zugetropft. Man läßt 36 h bei RT rühren und gießt dann in 50 ml gesättigte NaCl-Lösung, verdünnt mit Wasser und extrahiert mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der

Rückstand wird säulenchromato-graphisch mit Pentan : Diethylether = 2 : 1 gereinigt. Man erhält 247 mg (0.455 mmol, 79%) der Säure **9** als farbloses Öl. Allgemeine Daten:  $C_{29}H_{58}O_5Si_2$ , FG = 542.94 g/mol. Verbindung **9a** wird analog hergestellt. Aus 320 mg (0.590 mmol) **9a** erhält man 273 mg (0.490 mmol, 83%) **9a**.

**(3S,6R,7S,8S)-3,7-Di-tert-Butyldimethylsilyloxy-4,4,6,8-tetramethyl-5-oxo-tridec-12-ensäure-(1S)-1-[(E)-1-methyl-2-(2-methyl-thiazol-4-yl)-vinyl]-but-3-enyl-ester 17 und**  
**\* (3S,6R,7S,8S)-3,7-Di-tert-Butyldimethylsilyloxy-4,4,6,8,12-penta-methyl-5-oxo-tridec-12-ensäure-(1S)-1-[(E)-1-methyl-2-(2-methyl-thiazol-4-yl)-vinyl]-but-3-enyl-ester 17a**

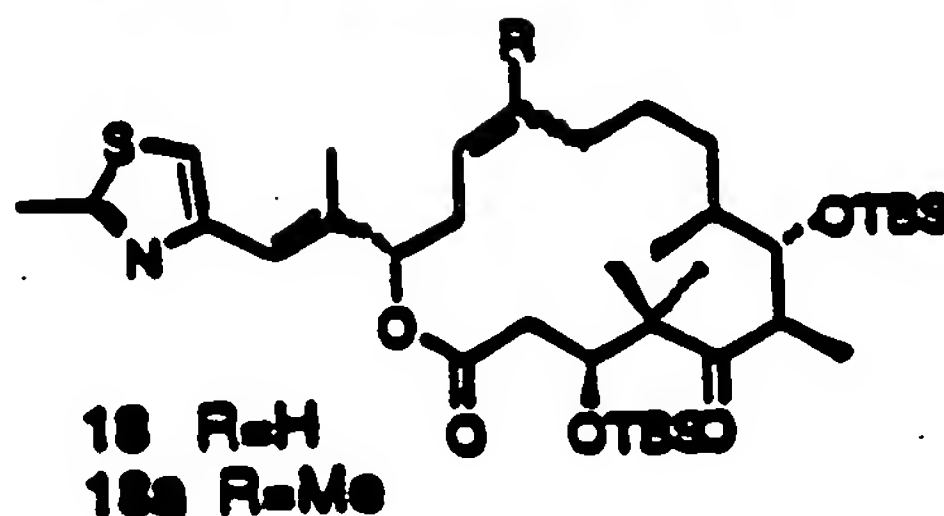


Veresterung nach B. Neises, W. Steglich *Angew. Chem.* 1978, 90, 558. Eine Lösung von 145 mg (0.268 mmol) Säure **9**, 58 mg (0.268 mmol) Alkohol **4** und 6,5 mg (0.0536 mmol, 0.2 eq) DMAP in 1,5 ml absolutem  $CH_2Cl_2$  wird bei 0 °C mit 72 mg (0.348 mmol, 1.3 eq) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Man rührt 10 min bei 0 °C und 12 h bei Raumtemperatur. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Flash-Chromatographie des Rückstandes mit Pentan/ $Et_2O$  (20:1) werden 157 mg (0.214 mmol, 80%) des Esters **17** erhalten.

\* Die Darstellung von Ester **17a** erfolgt analog. Aus 167 mg (0.30 mmol) **9a** und der äquimolaren Menge **4** erhält man 166 mg (0.222 mmol, 74%) **17a**.

(4*S*,7*R*,8*S*,9*S*,16*S*,13*Z*)-4,8-Di-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-5,5,7,9-tetra-methyl-16-[(*E*)-1-methyl-2-(2-methyl-thiazol-4-yl)-vinyl]-1-oxa-cyclohexadec-13-en-2,6-diol **18** und

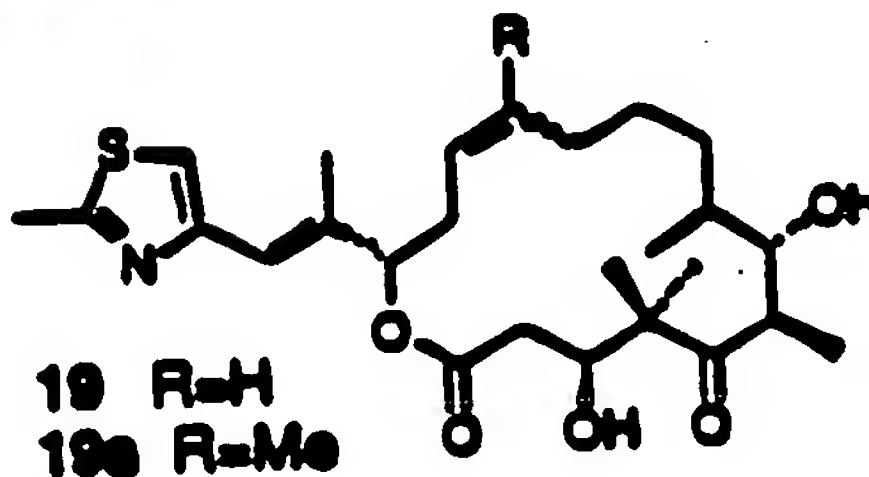
\*(4*S*,7*R*,8*S*,9*S*,16*S*,13*Z*)-4,8-Di-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-5,5,7,9,13-penta-methyl-16-[(*E*)-1-methyl-2-(2-methyl-thiazol-4-yl)-vinyl]-1-oxa-cyclohexadec-13-en-2,6-diol **18a**



Eine Ar-gesättigte Lösung von 49,3 mg (0.0671 mmol) des Esters **17** in 33,5 ml absolutem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (entsprechend einer Substratkonzentration von 0.002 M) wird mit 3,3 mg (6 mol-%) Cl<sub>2</sub>[Ru=CHPh](PCy<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Cy=Cyclohexyl) 16 h unter einer Argon-Atmosphäre gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Flash-Chromatographie des Rückstandes mit Pentan/Et<sub>2</sub>O (20:1) werden 44 mg (0.0630 mmol, 94%) der Verbindung **18** als 1:1-Gemisch mit seinem *E*-Isomeren erhalten.  
 • 49,0 mg (0.068 mmol, 68%) eines Gemisches aus **18a** und seinem *E*-Isomeren werden analog aus 74,8 mg (0.100 mmol) **17a** erhalten.

(4*S*,7*R*,8*S*,9*S*,16*S*,13*Z*)-4,8-Dihydroxy-5,5,7,9-tetra-methyl-16-[(*E*)-1-methyl-2-(2-methyl-thiazol-4-yl)-vinyl]-1-oxa-cyclohexadec-13-en-2,6-diol **19** ("Epothilin C") und

\*(4*S*,7*R*,8*S*,9*S*,16*S*,13*Z*)-4,8-Dihydroxy-5,5,7,9,13-penta-methyl-16-[(*E*)-1-methyl-2-(2-methyl-thiazol-4-yl)-vinyl]-1-oxa-cyclohexadec-13-en-2,6-diol **19a** ("Epothilin D")

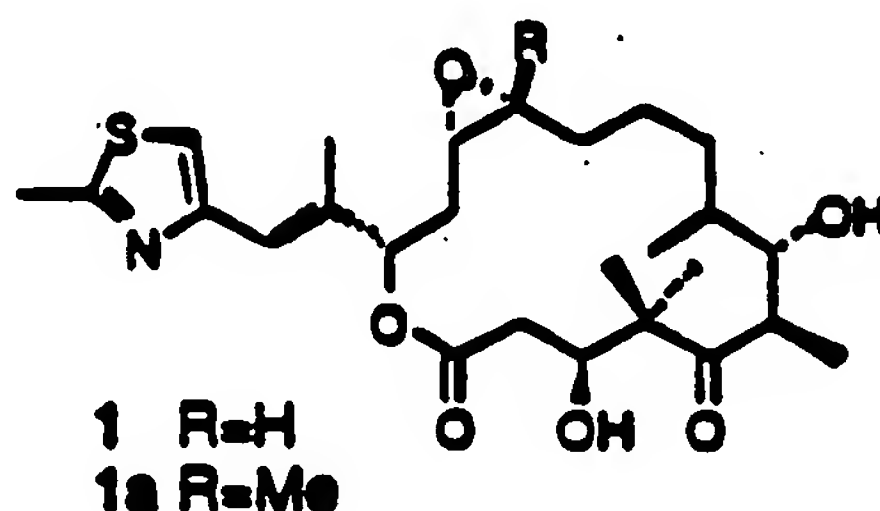


Eine Lösung von 35,3 mg (0.05 mmol) **18** (Z/E-Gemisch 1:1) in 2,4 ml Acetonitril/Et<sub>2</sub>O (1:1) wird bei 0 °C tropfenweise mit 0,27 ml Fluorwasserstoffsäure (40 %) versetzt. Nach Zugabe von einigen Glassplittern bzw. 0,027 ml

Hexafluorokieselsäure (30 %) rührt man 17 h bei Raumtemperatur. Die Reaktionsmischung wird mit 10 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung versetzt und dreimal mit je 20 ml  $\text{Et}_2\text{O}$  extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand durch eine Kieselgel-Säule mit  $\text{Et}_2\text{O}$  flash-chromatographiert. Man erhält 16,5 mg (0.0325 mmol, 65%) **19** als 1:1-Z/E-Gemisch.

\* 20,7 mg (0.042 mmol, 70%) **19a** (als Z/E-Gemisch) werden analog aus 43,2 mg (0.06 mmol) **18a** erhalten.

#### Epothillon A **1** und \*Epothillon B **1a**



Eine Lösung von 14,3 mg (0.03 mmol) **19** (1:1-Z/E-Gemisch) in 2,5 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wird bei

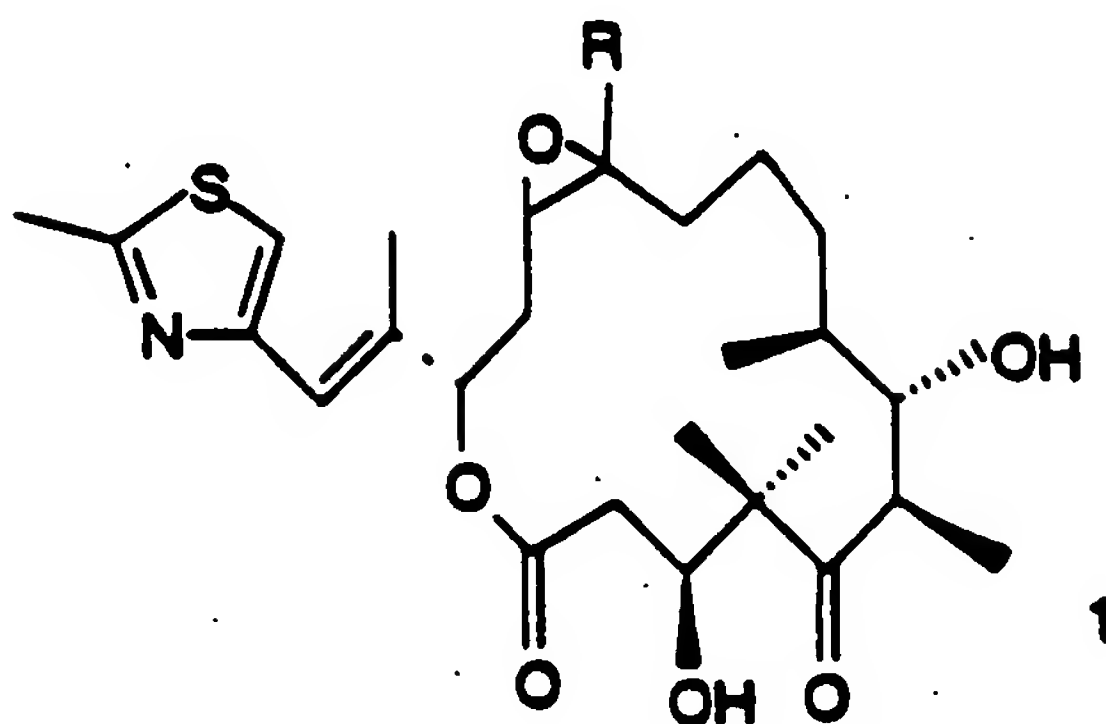
-35 °C unter Rühren tropfenweise mit 0,36 ml (0.035 mmol, 1.2 eq) einer frisch hergestellten Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton versetzt. Man rührt 2 h bei -35 °C, versetzt dann mit 5 ml einer 10%igen wässrigen Lösung von Eisen(II)-sulfat und extrahiert dreimal mit je 10 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand durch eine Kieselgel-Säule mit  $\text{Et}_2\text{O}$  flash-chromatographiert. Man erhält 7,1 mg (0.0144 mmol, 48%) Epothillon A.

\* 6,2 mg (0.0123 mmol, 41%) Epothillon B werden analog aus 14,8 mg (0.03 mmol) **19a** erhalten.

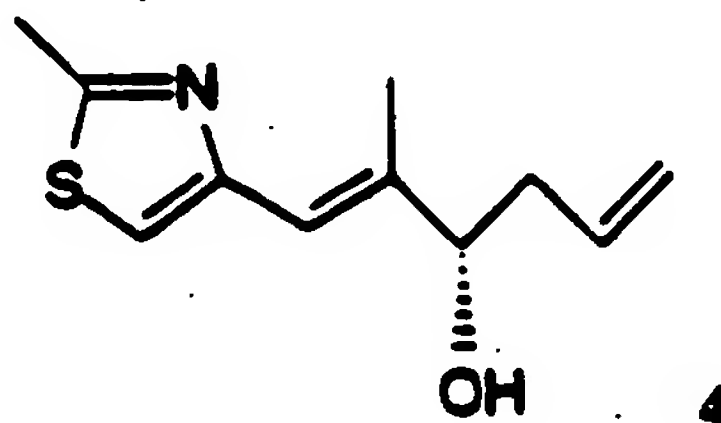
Die Erfindung betrifft auch Stereoisomere der Verbindungen gemäß der Ansprüche, wie diese üblicherweise innerhalb der Synthese anfallen.

## Patentansprüche

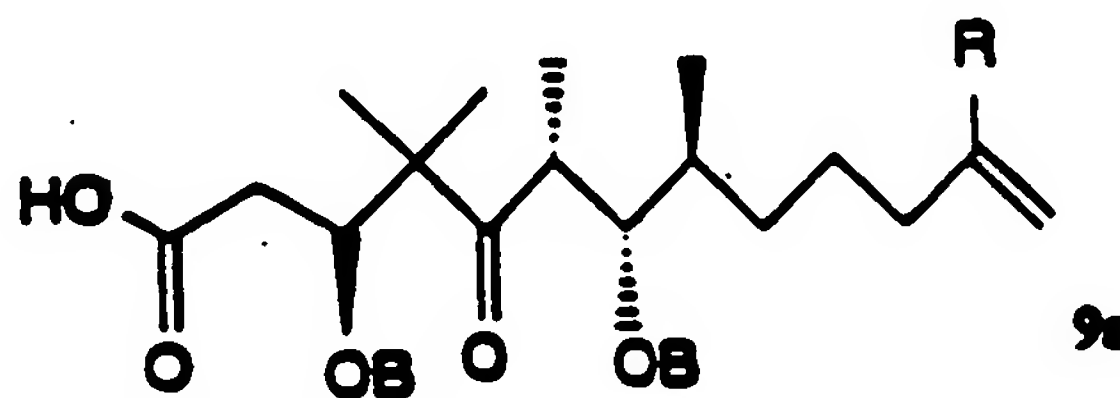
### 1.) Verfahren zur Herstellung von Epitholon A oder B der allgemeinen Formel 1



worin R=Wasserstoff (A) oder eine Methylgruppe (B) bedeuten,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
ein Thiazolalkyldien-alkohol-derivat der Formel 4



mit einer Carbonsäure der allgemeinen Formel 9a

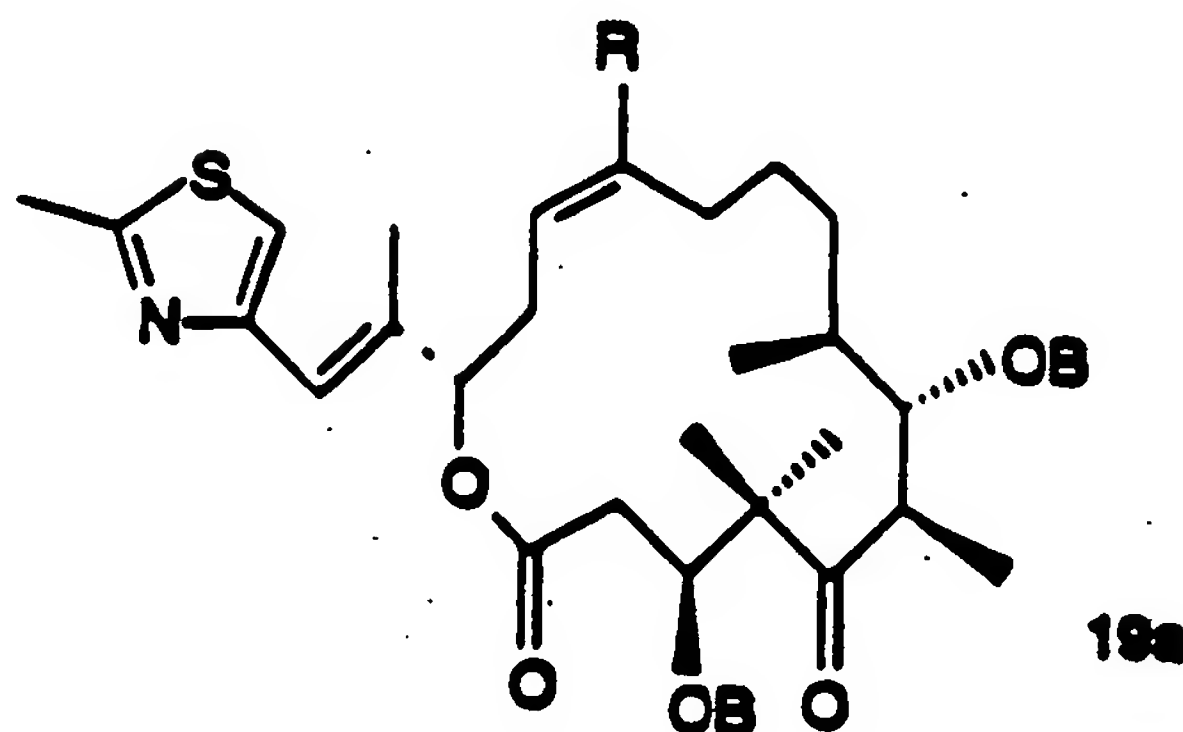


worin B= Benzyl-, Tetrahydropyranyl- und/oder eine Silylschutzgruppe(n) und  
R=Wasserstoff oder Methyl  
bedeuten.



verestert wird, der erhaltene Ester mittels einer Olefinmetathese in Gegenwart eines Edelmetallkatalysators ringgeschlossen, gegebenenfalls die Hydroxylschutzgruppen gespalten werden, die neu entstandene Doppelbindung epoxidiert wird und gegebenenfalls die Hydroxylschutzgruppen gespalten werden.

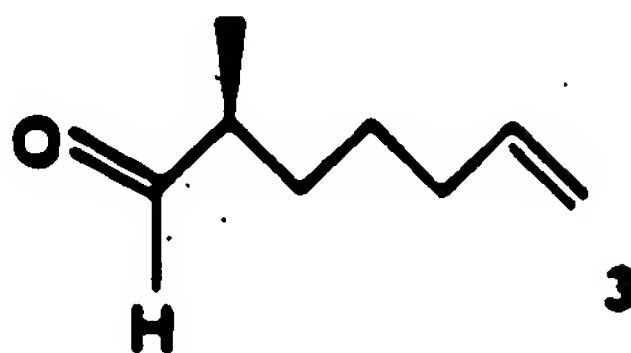
2.) Desoxy-epothilone gemäß allgemeiner Formel 19a



worin B = Wasserstoff, Benzyl-, p-Methoxybenzyl-, Tetrahydropyranyl- und/oder eine Silylschutzgruppe(n) und  
R = Wasserstoff oder Methyl  
bedeuten,

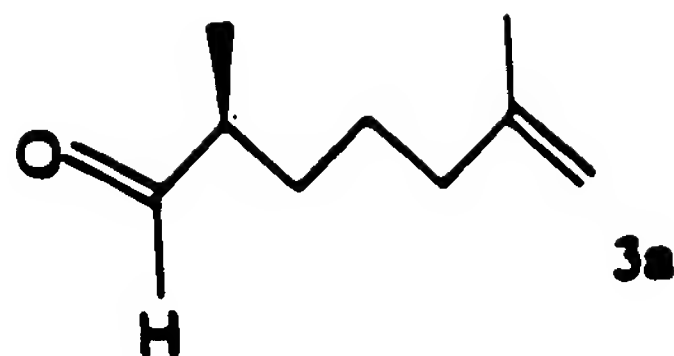
3.) 2-(2,2-Dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)-2-methyl-pentan-3-on 2

4.) 2-Methyl-6-heptenal 3

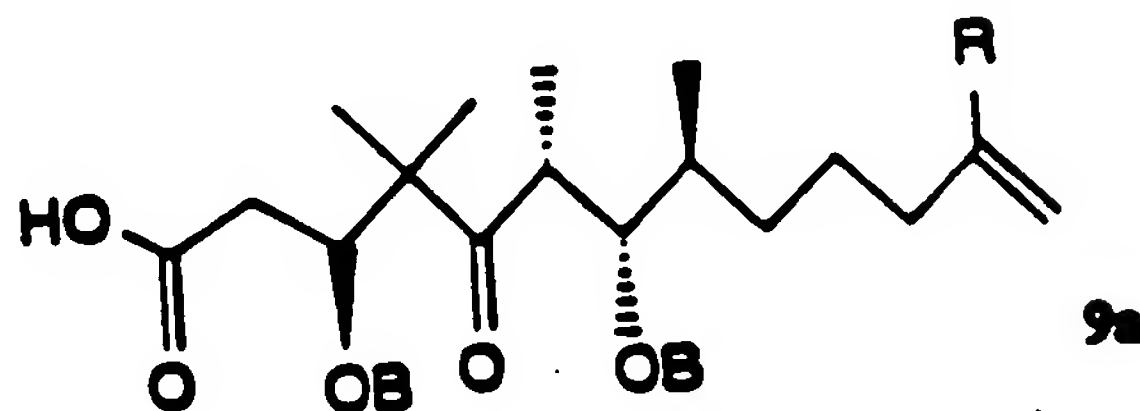




## 5.) 2,6-Dimethyl-6-heptenal 3a

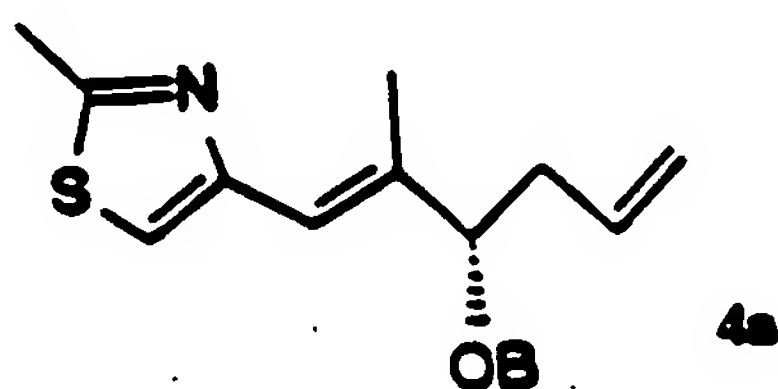


## 6.) Verbindungen der allgemeinen Formel 9a



worin B = Benzyl-, Tetrahydropyranyl- und/oder eine Silylschutzgruppe(n) und  
 R = Wasserstoff oder Methyl,  
 bedeuten,  
 und die Bedeutung von B im Molekül unterschiedlich sein kann.

## 7.) Verbindungen der allgemeinen Formel 4a



worin  
 B = Wasserstoff, Benzyl-, p-Methoxybenzyl-, Tetrahydropyranyl- oder eine  
 Silylschutzgruppe bedeutet.

## 8.) (4S,6S)-2-(2,2-dimethyl-[1,3] dioxan-4-yl)-5-hydroxy-2,4,6-trimethyl-undecan-3-on 5

## 9.) Stereoisomere der Verbindungen gemäß Ansprüche 1 - 6.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/DE 97/00111

A. CLASSIFICATION SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07D493/04 C07C47/21 C07D319/06 C07D277/24 C07C59/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category \* Citation of document, with abstract, where appropriate, of the relevant passages Reference to claim No.

Y	ACC.CHEM.RES.. vol. 28, 1995. pages 446-452. XP002035670 GRUBBS.R.H. ET AL.: "Ring-Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis" * see in particular page 2450, right-hand column, reaction 9 and following discussion see the whole document	1
Y	WO 93 10121 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH :CIBA GEIGY AG (CH)) 27 May 1993 cited in the application see the whole document	2.9

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of this C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \* A\* documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* T\* earlier documents that published on or after the international filing date
- \* L\* documents which may have priority claims or which are cited to establish the publication date of another document or other special feature (as specified)
- \* O\* documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* P\* documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\* T\* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underline the principle or theory underlying the invention

\* X\* documents of particular relevance the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\* Y\* documents of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art.

\* A\* documents member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 1997

Date of mailing of the international search report

02.08.97

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.O. 2918 Postfach 2  
NL - 2200 HV Rijswijk  
Tel. 1 - 31-70 340-2000, Te. 31 634 400 01  
Fax 1 - 31-70 340-2010

Authorized officer

Stellmach, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 97/00111

C(Communications) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of documents, with abstracts, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
Y	J.ANTIBIOT., vol. 49, no. 6, June 1996, pages 560-563, XP002035370 GERTH,K. ET AL: "Epothilones A and B: Antifungal and Cytotoxic Compounds from Sorangium cellulosum (Myxobacteria)" see the whole document ---	2.9
Y	CANCER RES., vol. 55, 1 June 1995, BALTIMORE, pages 2325-2333, XP002035371 BOLLAG,M.D. ET AL.: "Epoththilones, a New Class of Microtubule-stabilizing Agents with A Taxol-like Mechanism of Action" cited in the application see the whole document ---	2.9
X	J.ORG.CHEM., vol. 38, 1973, WASHINGTON, pages 2136-2143, XP002035671 MEYERS,A.I. ET AL.: * see page 2140, right-hand column, example 34 * see the whole document ---	4
Y	HELV.CHIM.ACTA., vol. 4, 1983, BASEL, pages 1253-1261, XP002035672 KELLER-SCHIERLEIN,W. ET AL: "(3S,8E)-1,3-Dihydroxy-8-decen-5-on, ein Stoffwechselprodukt von Stryptomycetes fimbriatus" * see page 1254, example 8 * see the whole document ---	2.7
A	CHEM.BER., vol. 100, 1967, WEINHEIM, pages 720-735, XP002035673 HERDEL,F. ET AL.: "Hepten-(6)-Säuren und Bicyclo[3.3.1]- bzw. -[3.2.0]heptanone-(6)" see the whole document ---	4.5
P,X	ANGEW.CHEM.INT.ED.ENGL., vol. 35, no. 23/24, January 1997, WEINHEIM, pages 2801-2803, XP002035359 BALOG,A. ET AL.: "Total Synthesis of (-)-Epothilone A" * see page 2803, scheme 4, examples 19, 11, 23 * see the whole document ---	1-9

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/DE 97/00111

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Quotation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>J.AM.CHEM.SOC., vol. 119, no. 11, 1997, WASHINGTON, pages 2733-2734, XP002035373 MENG,D. ET AL.: "Remote Effects in Macrolide Formation through Ring-Forming Olefin Metathesis: An Application to the Synthesis of Fully Active Epothilone Congeners" * see page 2733, connection 2Z, as well as page 2734, right-hand column, scheme 4 * see the whole document ---</p>	1,2,9
P,X	<p>TETRAHEDRON LETT., vol. 38, no. 12, 1997, OXFORD, pages 2061-2064, XP002035674 TAYLOR,R.E. ET AL.: "Towards the Synthesis of Epothilone A : Enantioselective Preparation of the Thiazole Sidechain and Macrocyclic Ring Closure" * see page 2062, fig.1, examples C13-C19, as well as page 2063, scheme IV * see the whole document ---</p>	1,3,7
P,X	<p>ANGEW.CHEM.INT.ED.ENGL., vol. 36, no. 1/2, 1997, WEINHEIM, pages 166-168, XP002035364 YANG,Z. ET AL.: "Total synthesis of Epothilone A : The Olefine Metathesis Approach" * see page 166, examples 6, 10 as well as page 167, examples 6,10,11 * see the whole document ---</p>	1-9
P,Y	<p>LIEBIGS ANN.CHEM., December 1996, WEINHEIM, pages 2135-2140, XP002035675 BLECHERT,S. ET AL.: "Synthesis of (-)-Streptenol A,(1-)-Streptenol B, C and D" see the whole document ---</p>	8
P,Y	<p>J.ORG.CHEM., vol. 61, no. 23, 1996, WASHINGTON, pages 7998-7999, XP002035361 MENG,D. ET AL: "Studies toward a Syntesis of Epothilone A: Use of Hydropyran Templates for the Management of Acyclic Stereochemical Relationships" see the whole document ---</p>	1-9

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 97/00111

## C(Classes) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Origin of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P.Y	J.ORG.CHEM.. vol. 61, no. 23, 1996, WASHINGTON, pages 8000-8001, XP002035362 BERTINATO,P. ET AL.: "Studies toward the Synthesis of Epothilone A: Stereocontrolled Assembly of the Acyl Region and Models for Macrocyclisation" see the whole document ---	1-9
P.Y	ANGEW.CHEM.INT.ED.ENGL.. vol. 35, no. 20, November 1996, WEINHEIM, pages 2399-2401, XP002035372 NICOLAOU,K.C.ET AL.: "An Approach to Epothilones Based on Olefin Metathesis" * see page 2400, examples 6,8 as well as scheme 3 * see the whole document ---	1-9
E	WO 97 19086 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH ;HOEFLE GERHARD (DE); KIFFE MICHAEL (D) 29 May 1997 see the whole document -----	1-9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
**PCT/DE 97/00111**

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9310121 A	27-05-93	DE 4138042 A	27-05-93
		AU 2943792 A	15-06-93
.....			
WO 9719086 A	29-05-97	DE 19542986 A	22-05-97
.....			



## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSOBJEKTES

IPK 6 C07D493/04 C07C47/21 C07D319/06 C07D277/24 C07C59/01

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Researchierter Mindestpräzision (Klassifikationssymbol und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07D

Researchierte aber nicht zum Mindestpräzision gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche benutzte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Beschreibung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ACC.CHEM.RES.. Bd. 28, 1995, Seiten 446-452, XP002035670 GRUBBS, R.H. ET AL.: "Ring-Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis" * siehe insbesondere Seite 2450, rechte Spalte, Reaktion 9 und folgende Diskussion * siehe das ganze Dokument ---	1
Y	WO 93 10121 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH ; CIBA GEIGY AG (CH)) 27. Mai 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	2,9

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentansprüche

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\* A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam angesehen ist

\* B\* Abstrakt, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\* L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zu rechtfertigen zu lassen, oder durch die die Veröffentlichungsdaten einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben)

\* O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Demonstration, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\* P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\* T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipien oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\* X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsmäßiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\* Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsmäßiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\* Z\* Veröffentlichung, die Mängel des internationalen Anmeldedatums

Datum des Abschusses der internationalen Recherche

21. Juli 1997

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

02.08.97

Name und Postanschrift der internationalen Recherchebehörde  
Europäisches Patentamt, P.O. Box 2911 Patentamt 2  
NL - 2200 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tel. 31 631 40 01  
Fax (+31-70) 340-2016

Bevollmächtigter Bevollmächtigter

Stellmach, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bemerkung zur Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Ber. Anspruch Nr.
Y	J.ANTIBIOT.. Bd. 49, Nr. 6, Juni 1996, Seiten 560-563, XP002035370 GERTH,K. ET AL.: "Epothilones A and B: Antifungal and Cytotoxic Compounds from Sorangium cellulosum (Myxobacteria)" siehe das ganze Dokument ---	2.9
Y	CANCER RES.. Bd. 55, 1.Juni 1995, BALTIMORE, Seiten 2325-2333, XP002035371 BOLLAG,M.D. ET AL.: "Epoththilones, a New Class of Microtubule-stabilizing Agents with A Taxol-like Mechanism of Action" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	2.9
X	J.ORG.CHEM.. Bd. 38, 1973, WASHINGTON, Seiten 2136-2143, XP002035671 MEYERS,A.I. ET AL.: * siehe Seite 2140, rechte Spalte, Beisp. 34 * siehe das ganze Dokument ---	4
Y	HELV.CHIM.ACTA.. Bd. 4, 1983, BASEL, Seiten 1253-1261, XP002035672 KELLER-SCHIERLEIN,W. ET AL: "(3S,8E)-1,3-Dihydroxy-8-decen-5-on, ein Stoffwechselprodukt von Stryptomyces fimbriatus" * siehe Seite 1254, Beispiel 8 * siehe das ganze Dokument ---	2.7
A	CHEM.BER.. Bd. 100, 1967, WEINHEIM, Seiten 720-735, XP002035673 NERDEL,F. ET AL.: "Hepten-(6)-Säuren und Bicyclo[3.3.1]- bzw. -[3.2.0]heptanone-(6)" siehe das ganze Dokument ---	4.5
P.X	ANGEW.CHEM.INT.ED.ENGL.. Bd. 35, Nr. 23/24, Januar 1997, WEINHEIM, Seiten 2801-2803, XP002035359 BALOG,A. ET AL.: "Total Synthesis of (-)-Epothilone A" * siehe Seite 2803, Schema 4, Beispiele 19,11,23 * siehe das ganze Dokument ---	1-9

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. J. der Pharmazie  
PCT/DE 97/00111

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Beschreibung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Int. Anspruch Nr.
P.X	J.AM.CHEM.SOC., Bd. 119, Nr. 11, 1997, WASHINGTON, Seiten 2733-2734, XP002035373 MENG, D. ET AL.: "Remote Effects in Macrolide Formation through Ring-Forming Olefin Metathesis: An Application to the Synthesis of Fully Active Epothilone Congeners" * siehe Seite 2733, Verbindung 2Z, sowie Seite 2734, rechte Spalte, Scheme 4 * siehe das ganze Dokument ---	1.2.9
P.X	TETRAHEDRON LETT., Bd. 38, Nr. 12, 1997, OXFORD, Seiten 2061-2064, XP002035674 TAYLOR, R.E. ET AL.: "Towards the Synthesis of Epothilone A : Enantioselective Preparation of the Thiazole Sidechain and Macrocyclic Ring Closure" * siehe Seite 2062, Fig. 1, Beisp. C13-C19 sowie Seite 2063, Scheme IV * siehe das ganze Dokument ---	1.3.7
P.X	ANGEW.CHEM.INT.ED.ENGL., Bd. 36, Nr. 1/2, 1997, WEINHEIM, Seiten 166-168, XP002035364 YANG, Z. ET AL.: "Total synthesis of Epothilone A : The Olefine Metathesis Approach" * siehe Seite 166, Beisp. 6, 10 sowie Seite 167, Beisp. 6, 10, 11 * siehe das ganze Dokument ---	1-9
P.Y	LIEBIGS ANN.CHEM., Dezember 1996, WEINHEIM, Seiten 2135-2140, XP002035675 BLECHERT, S. ET AL.: "Synthesis of (-)-Streptenol A, (1-)-Streptenol B, C and D" siehe das ganze Dokument ---	8
P.Y	J.ORG.CHEM., Bd. 61, Nr. 23, 1996, WASHINGTON, Seiten 7998-7999, XP002035361 MENG, D. ET AL.: "Studies toward a Synthesis of Epothilone A: Use of Hydropyran Templates for the Management of Acyclic Stereochemical Relationships" siehe das ganze Dokument ---	1-9

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Administration

PCT/DE 97/00111

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Beschreibung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bes. Anspruch Nr.
P.Y	<p>J.ORG.CHEM...  Bd. 61, Nr. 23, 1996, WASHINGTON,  Seiten 8000-8001, XP002035362  BERTINATO, P. ET AL.: "Studies toward the  Synthesis of Epothilone A:  Stereocontrolled Assembly of the Acyl  Region and Models for Macrocyclisation"  siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-9
P.Y	<p>ANGEW.CHEM.INT.ED.ENGL..  Bd. 35, Nr. 20, November 1996, WEINHEIM,  Seiten 2399-2401, XP002035372  NICOLAOU, K.C. ET AL.: "An Approach to  Epothilones Based on Olefin Metathesis"  * siehe Seite 2400, Beisp. 6, 8 sowie  Scheme 3 *  siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-9
E	<p>WO 97 19886 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH  ;HOEFLE GERHARD (DE); KIFFE MICHAEL (D)  29.Mai 1997  siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-9

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Anmeldung

PCT/DE 97/00111

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9310121 A	27-05-93	DE 4138042 A	27-05-93
		AU 2943792 A	15-06-93
WO 9719086 A	29-05-97	DE 19542986 A	22-05-97

1/1 WPIL - (C) Derwent Info. 1998- Image

AN - 98-193227 [17]

XR - 97-491318

XA - C98-061819

TI - Production of epothilone compounds with taxol-like activity - by total synthesis from new thiazolyl-hydroxy-alkyl-diene and protected dihydroxy-oxo-tridecanoic acid intermediates

DC - B02 B03

PA - (SCHD) SCHERING AG

(NOVS) NOVARTIS AG

IN - BAUER A; BOHM O M; CORDES M; LIMBERG A; SCHINZER D; BOEHM O M

NP - 4

NC - 071

PN - WO9808849 A1 980305 DW9817 C07D-493/04 Ger 048pp

N:AL AM AT AU AZ BB BG BR BY CA CH CN CZ DK EE ES FI GB GE HU IL IS JP  
KE KG KP KR KZ LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU  
SD SE SG SI SK TJ TM TR TT UA UG US UZ VN R:AT BE CH DE DK EA ES FI FR  
GB GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SZ UG

DE19846361 A1 980430 DW9823 C07C-069/738 012pp

DE19846362 A1 980430 DW9823 C07D-493/04 014pp

AU9721493 A 980319 DW9831 C07D-493/04 000pp

DS - AT BE CH DE DK EA ES FI FR GB GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE  
SZ UG

DN - AL AM AT AU AZ BB BG BR BY CA CH CN CZ DK EE ES FI GB GE HU IL IS JP  
KE KG KP KR KZ LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU  
SD SE SG SI SK TJ TM TR TT UA UG US UZ VN

PR - 98DE-1045362 981028; 98DE-1036343 980830; 98DE-1045361 981028

AP - 97WO-D00111 970115; 98DE-1045361 981028; [Add to DE19836343]

98DE-1045362 981028; 97AU-021493 970115; [Based on WO9808849]

IC - C07C-047/21; C07C-049/203; C07C-059/01; C07C-059/215; C07C-069/718  
; C07C-069/738; C07D-263/24; C07D-277/24; C07D-309/08; C07D-309/12  
; C07D-319/08; C07D-417/06; C07D-493/04; C07F-007/18C07C-047/21  
; C07C-049/203; C07C-059/01; C07C-059/215; C07C-069/718; C07C-069/738  
; C07D-263/24; C07D-277/24; C07D-309/08; C07D-309/12; C07D-319/08  
; C07D-417/06; C07D-493/04; C07F-007/18

AB - WO9808849 Production of epothilone A and B of formula (I) comprises esterification of a thiazolyl-hydroxyalkyldiene (II) with a protected 3,7-dihydroxy-8-oxo-tridecanoic acid (III) and conversion of the resulting ester into (I) by the following sequence of reactions: (a) ring closure involving olefin metathesis in the presence of a noble metal catalyst; (b) optional deprotection of protected hydroxy groups; (c) epoxidation and (d) deprotection of protected hydroxy groups as required. R = H (epothilone A) or Me (epothilone B); B = benzyt; tetrahydropyranylt; or silyl protecting group.

Also claimed are starting materials (II) and (III) and desoxy-epothilone intermediates (IV) (obtained from step (a) and optionally (b)); B1 = H; benzyt; p-methoxybenzyt; tetrahydropyranylt; or silyl protecting group.

Further claimed are 2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)-2-methyl-penta-  
n-3-one (V); 2-methyl-6-heptenal (VI); 2,6-dimethyl-6-heptenal (VII)  
and (4S,6S)-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)-5-hydroxy-2,4,6-trimeth



yl-undecan-3-one (sic) (DDHTU); used for the preparation of (III); as well as protected thiazolyl-hydroxyalkyldienes (VIII) used for the preparation of (II); B2 = benzyl; p-methoxybenzyl; tetrahydropyranyl; or silyl protecting group.

Note - The final claim appears to cover stereoisomers of all the above compounds except (DDHTU) and (VIII) sic; the phrasing of the claims is ambiguous.

(I) are known from DE 4138042.

USE - (I) have taxol-like activity and are of potential use in cancer therapy.

(Dwg. 0/0)

MC - B05-B01B B06-A02 B07-A02 B07-A03 B07-F01 B10-C04D B14-H01  
UP - 9817  
UE - 9831

Search statement 4

?

?/PN DE19836343;...LJ MAX

**\*\* SS 4: Results 1**

1/1 WPIL - (C) Derwent Info. 1998

AN - 97-491318 [48]

XR - 98-193227

XA - C97-156806

TI - New (di:methyl)-dioxanyl-methyl-pentanone and related compounds - useful as intermediates for epothilone A and B with taxol-like properties.

DC - 803 806

PA - (SCHD) SCHERING AG

IN - BOEHM O M; LIMBERG A; SCHINZER D

NP - 1

NC - 001

PN - DE19836343 C1 971023 DW9746 C07F-007/18 014pp

PR - 96DE-1036343 960830

AP - 96DE-1036343 960830

IC - C07D-263/20; C07D-277/24; C07D-319/06; C07D-493/04; C07F-007/02; C07F-007/18

AB - DE19836343 The compounds below and their stereoisomers are new. a) 2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)-2-methyl-pentan-3-one (3); b) 6-(tert-butylidimethylsilyloxy)-2-methyl-hexanal (4); c) (3,4E)-3-benzoyloxy-1-(tert-butylidimethylsilyloxy)-4-methyl-5-(2-ethylthiazol-4-yl)-pent-4-ene (8); d) (4S,6S)-10-(tert-butylidimethylsilyloxy)-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)-5-hydroxy-2,4,6-trimethyl-decan-3-one (80); and e) (3S,6R,7S,8S)-7-benzoyloxy-3-(tert-butylidimethylsilyloxy)-12-(tert-butylidiphenylsilyloxy)-4,4,6,8-tetramethyl-5-oxo-dodecanoic acid (87).

USE - The compounds are intermediates in the total synthesis of epothilone A and B (known from DE 4138042 and European Chemical Chronicle, vol. 1, No. 1, pp 7-10). Epothilone A and B have medicinal properties similar to taxol.

ADVANTAGE - The intermediates enable epothilone A and B to be produced simply and also provide potential for structural variations giving rise to analogues which are more active or which have fewer side effects.

(Dwg. 0/0)

MC - 806-801B 807-A04

UP - 9746

Search statement 5

BQ

**Not – WO 98/08849**

No EP Filings.  
 fank Hoffman/  
 james Grant/3727  
 fh24

5.X.98

File 351:DERWENT WPI 1963-1998/UD=9839;UP=9836;UM=9834  
 (c)1998 Derwent Info Ltd  
 \*File 351: Effective October 1, DialUnit rates adjusted for unrounding.  
 See HELP NEWS 351 for details.

## Set Items Description

?e pn=WO 9808849

Ref	Items	Index-term
E1	1	PN=WO 9808847
E2	1	PN=WO 9808848
E3	1	*PN=WO 9808849
E4	1	PN=WO 9808850
E5	1	PN=WO 9808851
E6	1	PN=WO 9808852
E7	1	PN=WO 9808853
E8	1	PN=WO 9808854
E9	1	PN=WO 9808855
E10	1	PN=WO 9808856
E11	1	PN=WO 9808857
E12	1	PN=WO 9808858

Enter P or PAGE for more

?se3

S1 1 PN="WO 9808849"

?t sl/19/1

1/19/1

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI  
 (c)1998 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

011776317 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 98-193227/199817

Related WPI Acc No: 97-491318

XRAM Acc No: C98-061819

**Production of epothilone compounds with taxol-like activity - by total  
 synthesis from new thiazolyl-hydroxy-alkyl-diene and protected  
 dihydroxy-oxo-tridecenic acid intermediates**

Patent Assignee: SCHERING AG (SCHD ); NOVARTIS AG (NOVS )

Inventor: BAUER A; BOHM O M; CORDES M; LIMBERG A; SCHINZER D; BOEHM O M

Number of Countries: 071 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
WO 9808849	A1	19980305	WO 97DE111	A	19970115	C07D-493/04	199817 B
DE 19645361	A1	19980430	DE 1045361	A	19961028	C07C-069/738	199823
DE 19645362	A1	19980430	DE 1045362	A	19961028	C07D-493/04	199823
AU 9721493	A	19980319	AU 9721493	A	19970115	C07D-493/04	199831

**Priority Applications (No Type Date): DE 1045362 A 19961028; DE 1036343 A  
 19960830; DE 1045361 A 19961028**

Patent Details:

Patent Kind Lan Pg Filing Notes Application Patent

WO 9808849 A1 G 48

Designated States (National): AL AM AT AU AZ BB BG BR BY CA CH CN CZ DK  
EE ES FI GB GE HU IL IS JP KE KG KP KR KZ LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN  
MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK TJ TM TR TT UA UG US UZ VN

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK EA ES FI FR GB GR IE IT KE  
LS LU MC MW NL OA PT SD SE SZ UG

DE 19645361 A1 12 Add to DE 19636343

DE 19645362 A1 14

AU 9721493 A Based on WO 9808849

Abstract (Basic): WO 9808849 A

Production of epothilone A and B of formula (I) comprises esterification of a thiazolyl-hydroxyalkyldiene (II) with a protected 3,7-dihydroxy-5-oxo-tridecenoic acid (III) and conversion of the resulting ester into (I) by the following sequence of reactions: (a) ring closure involving olefin metathesis in the presence of a noble metal catalyst; (b) optional deprotection of protected hydroxy groups, (c) epoxidation and (d) deprotection of protected hydroxy groups as required. R = H (epothilone A) or Me (epothilone B); B = benzyl; tetrahydropyranyl; or silyl protecting group.

Also claimed are starting materials (II) and (III) and desoxy-epothilone intermediates (IV) (obtained from step (a) and optionally (b)): B1 = H; benzyl; p-methoxybenzyl; tetrahydropyranyl; or silyl protecting group.

Further claimed are 2-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)-2-methyl-pentan-3-one (V); 2-methyl-6-heptenal (VI), 2,6-dimethyl-6-heptenal (VII) and (4S,6S)-2-(2,2-dimethyl-[1,3]-dioxan-4-yl)-5-hydroxy-2,4,6-trimethyl-undecan-3-one (sic) (DDHTU); used for the preparation of (III); as well as protected thiazolyl-hydroxyalkyldienes (VIII) used for the preparation of (II): B2 = benzyl; p-methoxybenzyl; tetrahydropyranyl; or silyl protecting group.

Note - The final claim appears to cover stereoisomers of all the above compounds except (DDHTU) and (VIII) [sic; the phrasing of the claims is ambiguous].

(I) are known from DE 4138042.

USE - (I) have taxol-like activity and are of potential use in cancer therapy.

Dwg.0/0

Title Terms: PRODUCE; COMPOUND; TAXOL; ACTIVE; TOTAL; SYNTHESIS; NEW; THIAZOLYL; HYDROXY; ALKYL; DIENE; PROTECT; DI; HYDROXY; OXO; ACID; INTERMEDIATE

Derwent Class: B02; B03

International Patent Class (Main): C07C-069/738; C07D-493/04

International Patent Class (Additional): C07C-047/21; C07C-049/203;

C07C-059/01; C07C-059/215; C07C-069/716; C07D-263/24; C07D-277/24;

C07D-309/06; C07D-309/12; C07D-319/06; C07D-417/06; C07F-007/18

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B05-B01B; B06-A02; B07-A02; B07-A03; B07-F01;

B10-C04D; B14-H01

Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* A544 A910 A940 A970 B515 C017 C100 C710 C720 M411 M730 M903 Q421

\*02\* D015 D016 D030 D160 F012 F014 F710 H4 H402 H422 H7 H721 H8 J5 J522

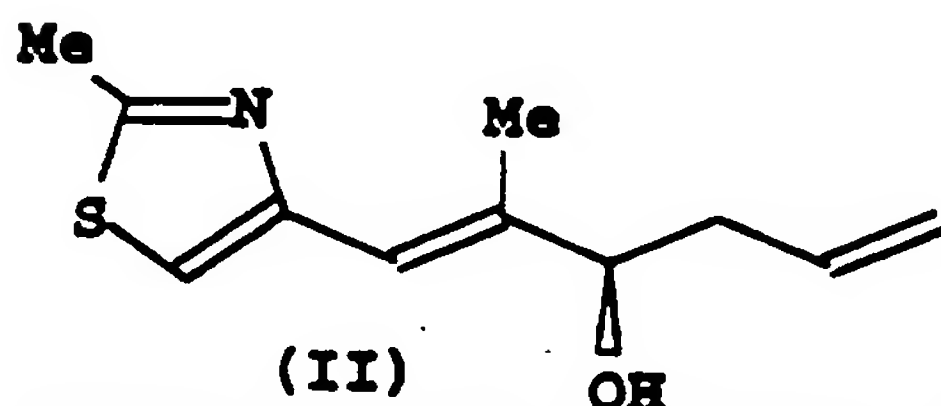
L9 L942 M1 M126 M133 M210 M211 M240 M283 M313 M321 M331 M342 M412

M511 M521 M530 M540 M720 M800 M903 M904 N209 N213 N241 N242 N262  
N282 N305 N306 N309 N313 N341 N342 N362 N441 N480 N511 N512 P633  
9817-35801-P 40014

\*03\* B614 B711 B712 B720 B743 B744 B831 B832 F012 F013 F014 F015 F016  
F017 F019 F123 F130 F199 F710 G010 G013 G019 G100 H401 H402 H421  
H422 H521 H522 H541 H542 H7 H721 J5 J522 L9 L942 M1 M126 M129 M133  
M141 M149 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222 M223  
M224 M225 M226 M231 M232 M233 M240 M250 M272 M281 M282 M283 M311  
M313 M321 M322 M331 M342 M373 M391 M392 M411 M413 M510 M522 M523  
M530 M531 M532 M540 M710 M800 M903 M904 9817-35802-N 40014 00561  
\*04\* B414 B514 B614 B711 B712 B720 B743 B744 B831 B832 F012 F013 F014  
F019 F123 F199 G010 G019 G100 H521 H522 H581 H582 H7 H721 J0 J011 J1  
J171 J5 J581 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222 M223  
M224 M225 M226 M231 M232 M233 M250 M280 M283 M311 M315 M316 M321  
M322 M333 M342 M343 M373 M381 M391 M392 M411 M413 M414 M510 M520  
M521 M522 M530 M531 M532 M540 M710 M800 M903 M904 9817-35805-N 40014  
00561  
\*05\* B614 B711 B720 B743 B831 F012 F013 F014 F019 F123 F710 G010 G013  
G100 H401 H481 H521 H541 H581 H7 H722 M210 M211 M212 M213 M214 M215  
M216 M220 M221 M222 M223 M224 M225 M226 M231 M232 M233 M240 M250  
M272 M281 M283 M311 M315 M321 M333 M342 M373 M391 M392 M411 M413  
M510 M521 M522 M530 M531 M540 M710 M800 M903 M904 9817-35806-N 40014  
00561  
\*06\* F012 F014 F017 F163 H401 H481 J5 J581 M210 M211 M212 M240 M262 M281  
M282 M313 M316 M321 M331 M333 M340 M342 M372 M381 M391 M413 M510  
M521 M530 M540 M710 M903 M904 9817-35803-N 40014 00561 00262  
\*07\* H7 H721 J4 J471 M220 M221 M222 M232 M262 M281 M320 M416 M710 M800  
M903 M904 9817-35804-N 40014 00561 00262

Ring Index Numbers: ; 40014; 00561; 00262

Generic Compound Numbers: 9817-35801-P; 9817-35802-N; 9817-35805-N;  
9817-35806-N; 9817-35803-N; 9817-35804-N



{INSERT IMAGE BMP "W0B3B13D.bmp"}

?save temp

Temp SearchSave "TD335" stored

?b 345;exs

05oct98 13:28:07 User301264 Session D786.2

File 345:Inpadoc/Fam.& Legal Stat. 1998/UD=9839

(c) 1998 European Patent Office

\*File 345: The EPO is working to correct some garbled Japanese titles.

Set Items Description

--- -----

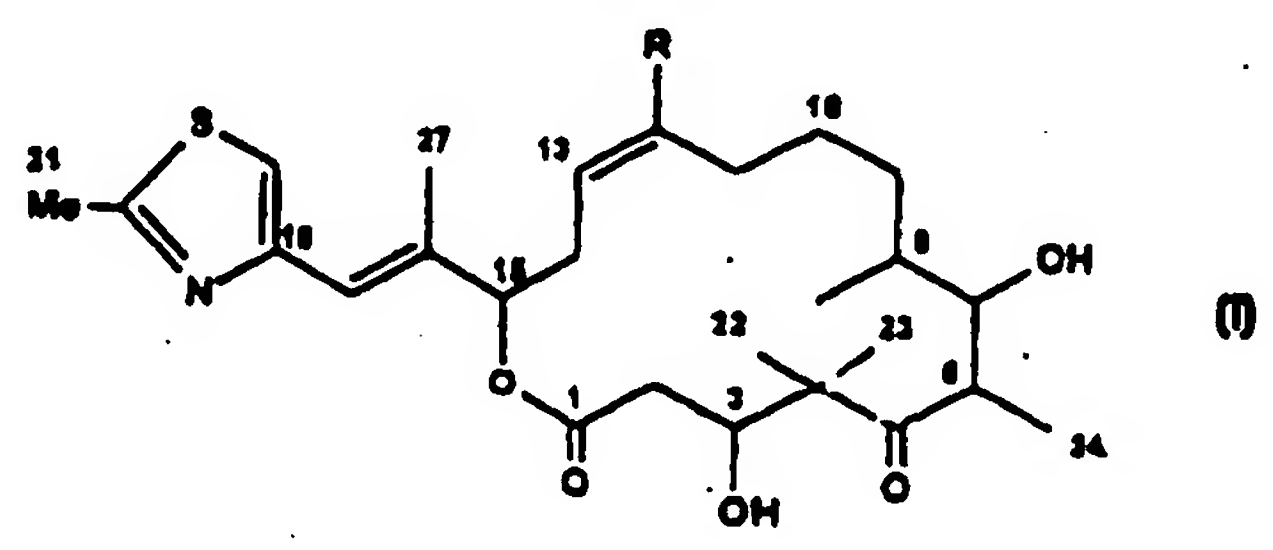
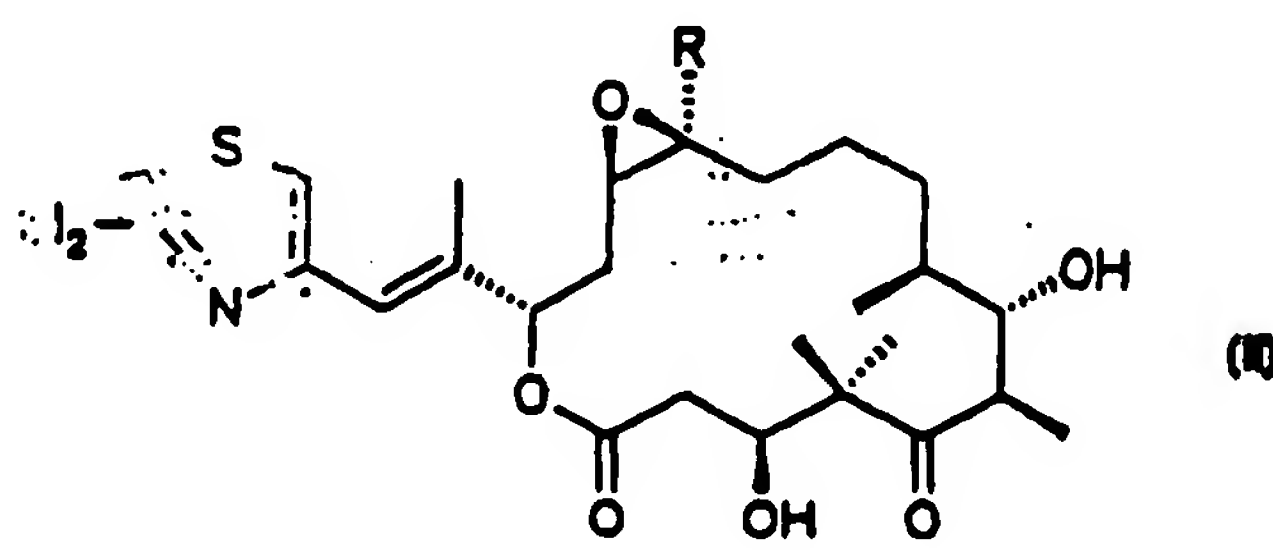
Executing TD335

>>>SET HILIGHT: use ON, OFF, or 1-5 characters

S1 1 PN="WO 9808849"

?t sl/3/1

**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: <b>C07D 417/06, 493/04, C12P 17/08, A01N 43/78, A61K 31/425 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00)</b>		<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/22461</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>28. Mai 1998 (28.05.98)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP97/06442</b> (22) Internationales Anmeldedatum: <b>18. November 1997 (18.11.97)</b> (30) Prioritätsdaten: <b>196 47 580.5 18. November 1996 (18.11.96) DE</b> <b>197 07 506.1 25. Februar 1997 (25.02.97) DE</b> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten außer US): <b>GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</b> (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>REICHENBACH, Hans [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). GERTH, Klaus [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). STEINMETZ, Heinrich [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</b> (74) Anwälte: <b>BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters &amp; Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).</b>		(81) Bestimmungsstaaten: <b>AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</b>  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: <b>EPOTHILONE C, D, E AND F, PRODUCTION PROCESS, AND THEIR USE AS CYTOSTATIC AS WELL AS PHYTOSANITARY AGENTS</b> (54) Bezeichnung: <b>EPOTHILONE C, D, E UND F, DEREN HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG ALS CYTOSTATISCHE MITTEL BZW. ALS PFLANZENSCHUTZMITTEL</b> (57) Abstract <p>The present invention concerns the epothilone, especially epothilone C (R = hydrogen) and epothilone D (R = methyl) of formula (I), as well as epothilone E (R = hydrogen) and epothilone F (R = methyl) of formula (II), the production process and their application for producing therapeutic agents, including cytostatic agents, as well as phytosanitary agents.</p> <p>(57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilone, insbesondere Epothilon C (R = Wasserstoff) und Epothilon D (R = Methyl) der Formel (I) sowie Epothilon E (R = Wasserstoff) und Epothilon F (R = Methyl) der Formel (II), deren Herstellung, sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen, insbesondere cytostatischen Mitteln sowie Mitteln für den Pflanzenschutz.</p></p>			
		 (I)	
		 (II)	



# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäÙ dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SE	Sweden
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MX	Die ehemalige japanische Republik Mexiko	TM	Türkei
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MM	Myanmar	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan		Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia		Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan		Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea		Norwegen		
CM	Kamerun		Korea		Polen		
CN	China	KR	Republik Korea		Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan		Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia		Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein		Saudi Arabien		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka		Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia		Singapur		

**EPOTHILONE C, D, E UND F, DEREN HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG ALS CYTOSTATISCHE MITTEL BZW. ALS PFLANZENSCHUTZMITTEL**

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilone C, D, E und F, deren Herstellung sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.

**Epothilone C und D**

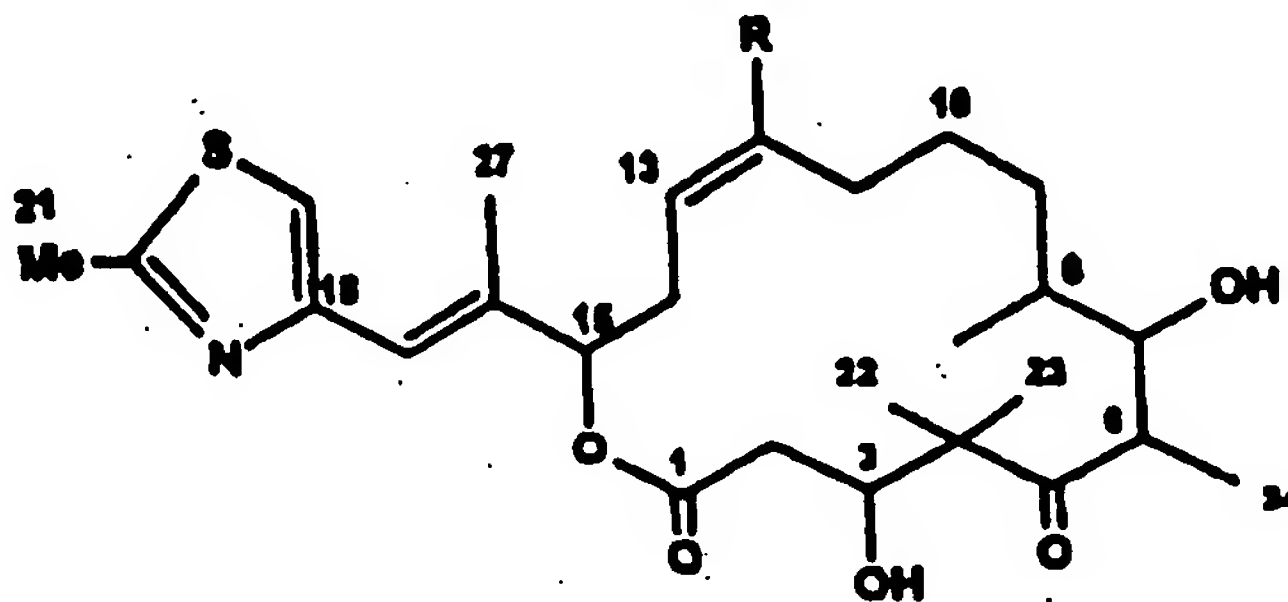
Gemäß einer Ausführungsform betrifft die Erfindung Epothilone [C und D], die dadurch gewinnbar sind, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert,
- (b) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt und mit einem Wasser/Methanol-Gemisch wäscht,
- (c) das gewaschene Adsorberharz mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,

- (d) das gewonnene Konzentrat mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und zwischen Methanol und Hexan verteilt,
- (e) die methanolische Phase zu einem Raffinat einengt und das Konzentrat an einer Sephadex-Säule fraktioniert,
- (f) eine Fraktion mit Stoffwechselprodukten des eingesetzten Mikroorganismus gewinnt,
- (g) die gewonnene Fraktion an einer C18-Umkehrphase mit einem Methanol/Wasser-Gemisch chromatographiert und in zeitlicher Reihenfolge
- nach einer ersten Fraktion mit Epothilon A und
  - einer zweiten Fraktion mit Epothilon B
  - eine dritte Fraktion mit einem ersten weiteren Epothilon und
  - eine vierte Fraktion mit einem zweiten weiteren Epothilon gewinnt und
- (h1) und das Epothilon der ersten weiteren Fraktion und/oder
- (h2) das Epothilon der zweiten weiteren Fraktion isoliert.

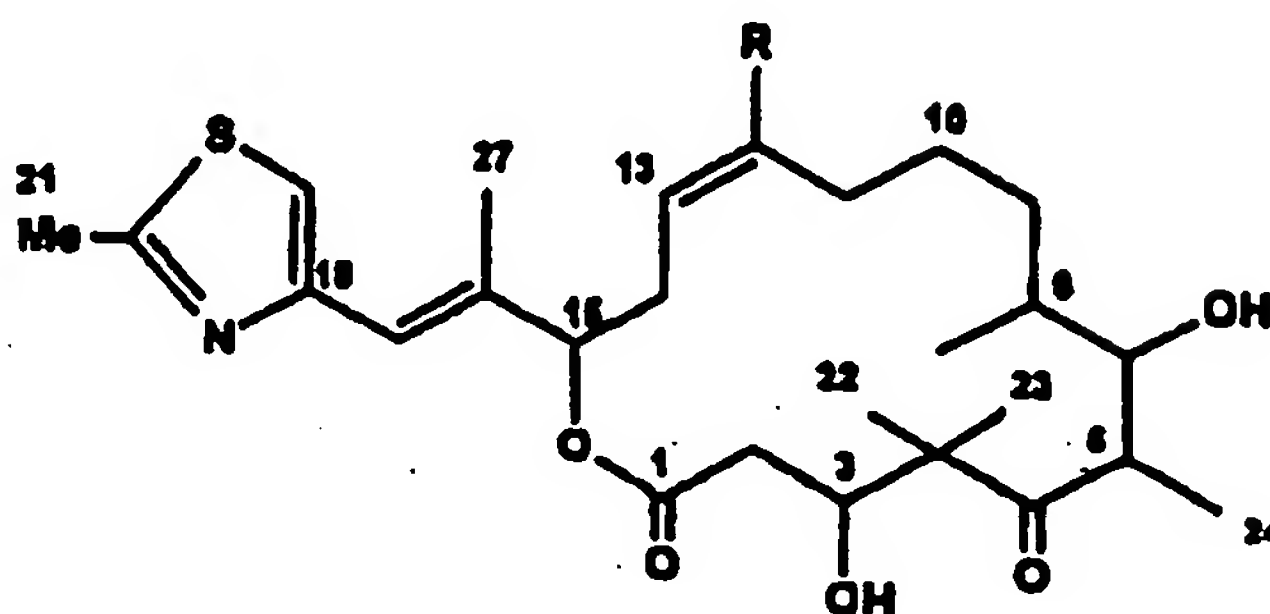
Ferner betrifft die Erfindung ein Epothilon [C] der Summenformel  $C_{26}H_{39}NO_5S$ , gekennzeichnet durch das  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

Ferner betrifft die Erfindung Epothilon C der Formel:



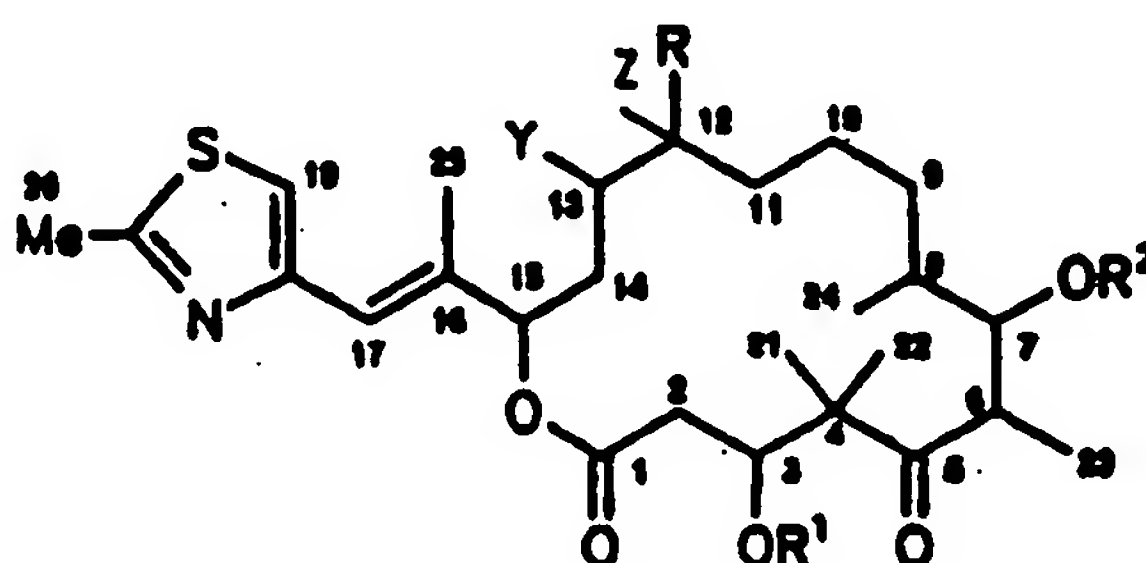
Epothilon C     R = H

Ferner betrifft die Erfindung Epothilon D der Formel:



**Epothilon D**     **R = CH<sub>3</sub>**

Epothilone C und D können zur Herstellung der Verbindungen der folgenden Formel 1 verwendet werden, wobei zu deren Derivatisierung auf die in WO-A-97/19 086 beschriebenen Derivatisierungsmethoden verwiesen werden kann.



**In der vorstehenden Formel 1 bedeuten:**

R = H, C<sub>1-4</sub>-Alkyl;  
R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> = H, C<sub>1-6</sub>-Alkyl.

C<sub>1-6</sub>-Acyl-Benzoyl,  
C<sub>1-4</sub>-Trialkylsilyl,  
Benzyl,  
Phenyl,  
C<sub>1-6</sub>-Alkoxy-,  
C<sub>6</sub>-Alkyl-, Hydroxy- und Halogen-  
substituiertes Benzyl bzw. Phenyl;

wobei auch zwei der Reste R<sup>1</sup> bis R<sup>5</sup> zu der Gruppierung -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt;

Y und Z sind entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Wasserstoff, Halogen, wie F, Cl, Br oder J, Pseudohalogen, wie -NCO, -NCS oder -N<sub>3</sub>, OH, O-(C<sub>1-6</sub>)-Acyl, O-(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, O-Benzoyl. Y und Z können auch das O-Atom eines Epoxides sein, wobei Epothilon A und B nicht beansprucht werden, oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden.

So kann man die 12,13-Doppelbindung selektiv

- hydrieren, beispielsweise katalytisch oder mit Diimin, wobei man eine Verbindung der Formel 1 mit Y = Z = H erhält; oder
- epoxidieren, beispielsweise mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure, wobei man eine Verbindung der Formel 1 mit Y mit Z = -O- erhält; oder
- in die Dihalogenide, Dipseudohalogenide oder Diazide umwandeln, wobei man eine Verbindung der Formel 1 mit Y und Z = Hal, Pseudo-hal oder N<sub>3</sub> erhält.

#### **Epothilone E und F**

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Biotransformant von Epothilon A, der dadurch gewinnbar ist, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon A versetzt,
- (b) die mit Epothilon A versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,
- (c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,
- (d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,
- (e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial: Nucleosil 100 C-18 7  $\mu$ m

Säulenmaße: 250 x 16 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 60 : 40

Fluß: 10 ml/min

und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem  $R_t$ -Wert von 20 min abtrennt und den Biotransformanten isoliert.

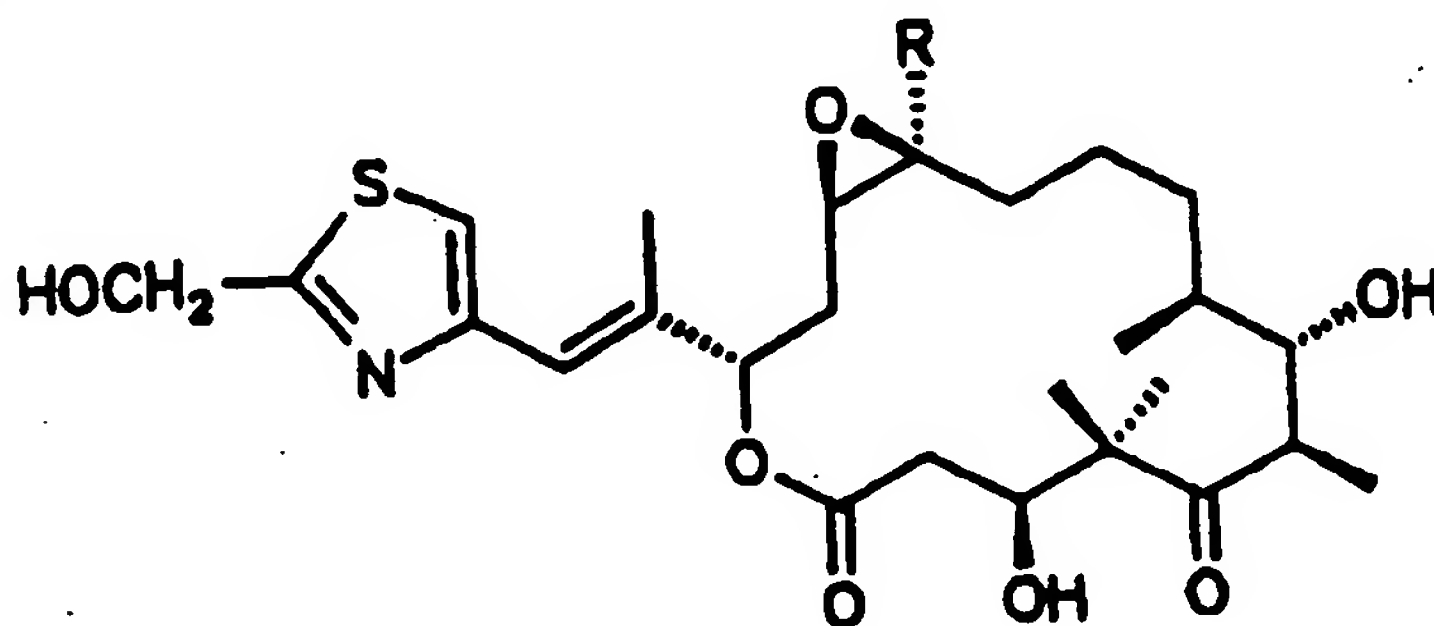
Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon A, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon A, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei der mehr Tage inkubiert.



Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung der Summenformel  $C_{26}H_{39}NO_7S$ , gekennzeichnet durch folgendes  $^1H$ -NMR-Spektrum (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 2.38 (2- $H_a$ ), 2.51 (2- $H_b$ ), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- $H_2$ , 10- $H_2$ , 11- $H_2$ ), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14- $H_a$ ), 2.07 (14- $H_b$ ), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21- $H_2$ ), 1.05 (22- $H_3$ ), 1.32 (23- $H_3$ ), 1.17 (24- $H_3$ ), 0.97 (25- $H_3$ ), 2.04 (27- $H_3$ )

Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung (Epothilon E) der Formel:



Epothilon E    R = H

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Biotransformant von Epothilon B, der dadurch gewinnbar ist, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon B versetzt,

- (b) die mit Epothilon B versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,
- (c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,
- (d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,
- (e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial: Nucleosil 100 C-18  $\cdot$  7  $\mu$ m  
Säulenmaße: 250 x 16 mm  
Laufmittel: Methanol/Wasser = 60 : 40  
Fluß: 10 ml/min

und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem  $R_t$ -Wert von 24,5 min abtrennt und den Biotransformaten isoliert.

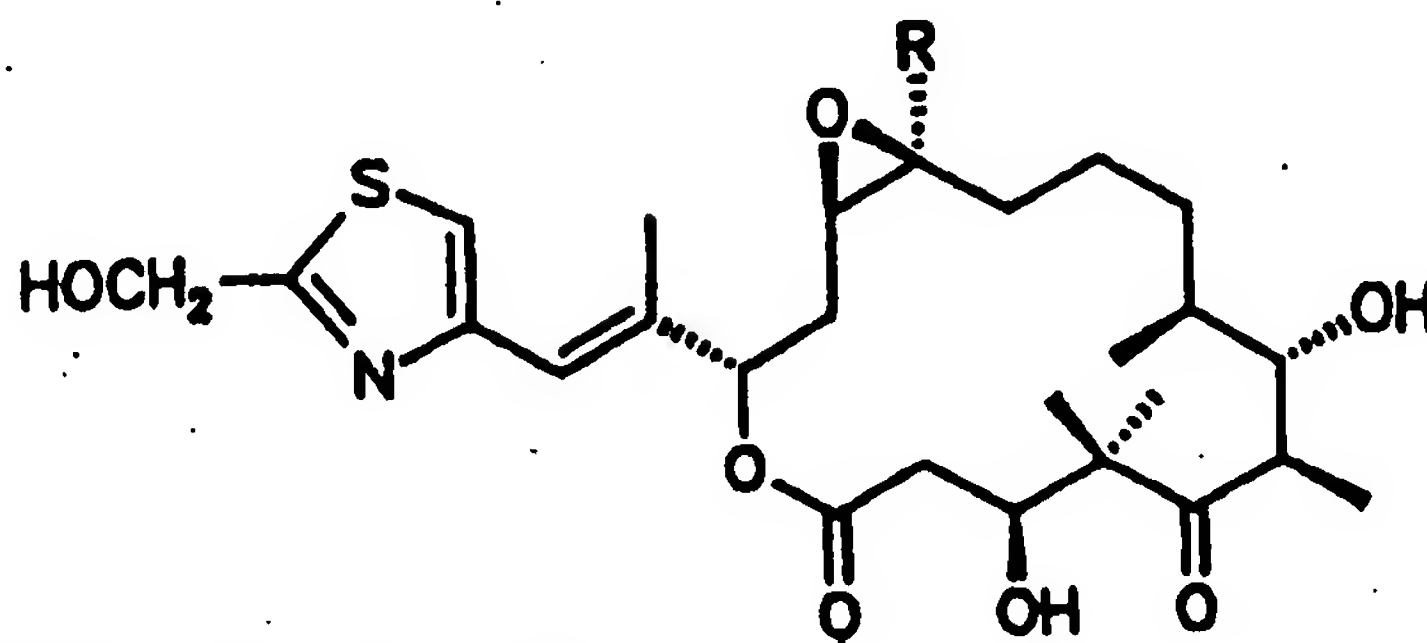
Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon B, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon B, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei oder mehr Tage inkubiert.

Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung der Summenformel  $C_{27}H_{41}NO_7S$ , gekennzeichnet durch folgendes  $^1H$ -NMR-Spektrum (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 2.37 (2- $H_a$ ), 2.52 (2- $H_b$ ), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- $H_2$ , 10- $H_2$ , 11- $H_2$ ), 2.78 (13-H), 1.91 (14-H), 2.06 (14- $H_b$ ), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H),

7.10 (19-H), 4.89 (21-H<sub>2</sub>), 1.05 (22-H<sub>3</sub>), 1.26 (23-H<sub>3</sub>), 1.14 (24-H<sub>3</sub>), 0.98 (25-H<sub>3</sub>), 1.35 (26-H<sub>3</sub>), 2.06 (27-H<sub>3</sub>).

Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung (Epothilon F) der Formel:



Epothilon F    R = CH<sub>3</sub>

#### Herstellung und Mittel

Die erfindungsgemäßen Verbindungen bzw. Epothilone sind mit den vorstehend angeführten Maßnahmen gewinnbar.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone C, D, E und F bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten zeigen und/oder Immunsuppression bewirken.

und/oder zur Bekämpfung maligner Tumore eingesetzt werden, wobei sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

### Beispiele

#### Beispiel 1:

##### Epothilone C und D

A. Produktionsstamm und Kulturbedingungen entsprechend dem Epothilon Basispatent DE-B-41 38 042.

##### B. Produktion mit DSM 6773

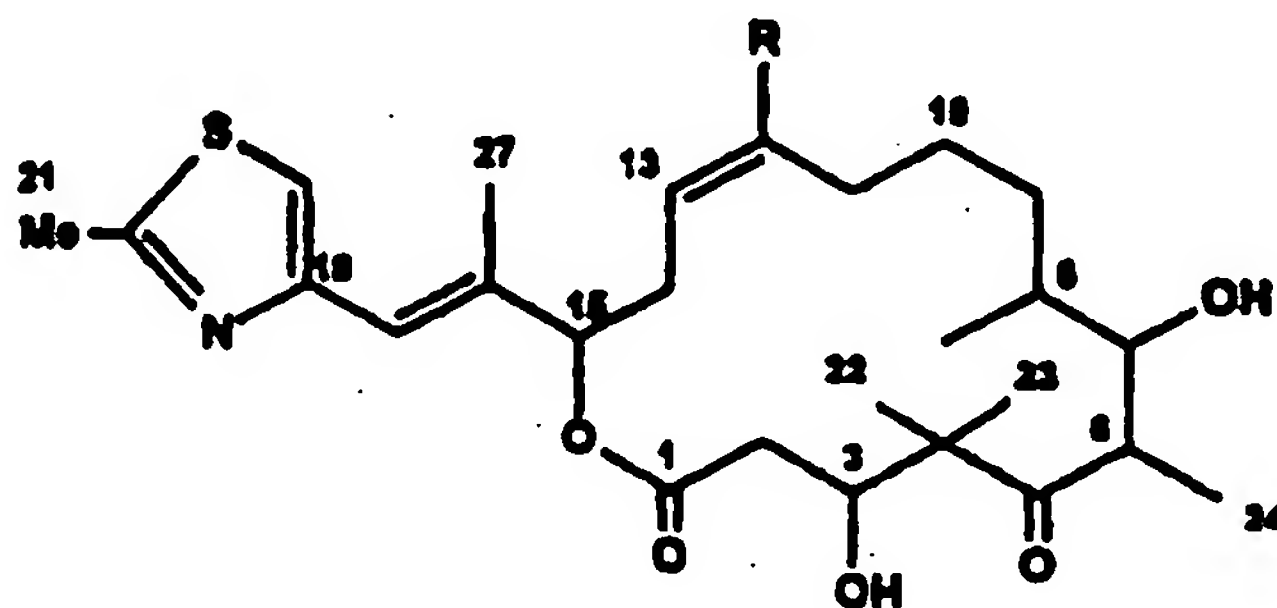
75 l Kultur werden wie im Basispatent beschrieben angezogen und zum Animpfen eines Produktionsfermenters mit 700 l Produktionsmedium aus 0.8 % Stärke, 0.2 % Glukose, 0.2 % Soya-mehl, 0.2 % Hefeextrakt, 0.1 %  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 %  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7.4 und optional 15 l Adsorberharz Amberlite XAD-16 verwendet. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage bei 30 C, Belüftung mit 0.1 NL/m<sup>3</sup>. Durch Regulierung der Drehzahl wird der pO<sub>2</sub> bei 30 % gehalten.

##### C. Isolierung

Das Adsorberharz wird mit einem 0.7 m<sup>2</sup>, 100 mesh Prozeßfilter von der Kultur abgetrennt und durch Waschen mit 3 Bettvolumen Wasser/Methanol 2:1 von polaren Begleitstoffen befreit. Durch 4 Bettvolumen Methanol wird ein Rohextrakt gewonnen, der i. Vak. bis zum Auftreten der Wasserphase eingedampft wird.

Diese wird dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Eindampfen der organischen Phase ergibt 240 g Rohextrakt, der zwischen Methanol und Heptan verteilt wird, um lipophile Begleitstoffe abzutrennen. Aus der Methanolphase werden durch Eindampfen i. Vak. 180 g Raffinat gewonnen, das in drei Portionen über Sephadex LH-20 (Säule 20 x 100 cm, 20 ml/min Methanol) fraktioniert wird. Die Epothilone sind in der mit 240 - 300 min Retentionszeit eluierten Fraktion von insgesamt 72 g enthalten. Zur Trennung der Epothilone wird in drei Portionen an Lichrosorb RP-18 (15 µm, Säule 10 x 40 cm, Laufmittel 180 ml/min Methanol/Wasser 65:35) chromatographiert. Nach Epothilon A und B werden mit  $R_t$  = 90-95 min Epothilon C und 100-110 min Epothilon D eluiert und nach Eindampfen i. Vak. in einer Ausbeute von jeweils 0.3 g als farblose Öle gewonnen.

#### D. Physikalische Eigenschaften



Epothilon C     $R = H$   
 Epothilon D     $R = CH_3$

#### Epothilon C

$C_{26}H_{39}NO_5S$  [477]

ESI-MS: ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 478.5 für [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C sieh NMR-Tabelle

DC:R<sub>f</sub> = 0,82

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =  
9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R<sub>t</sub> = 11,5 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

**Epothilon D**

C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>5</sub>S [491]

ESI-MS: (positiv Ionen): 492,5 für [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C siehe NMR-Tabelle

DC:R<sub>f</sub> = 0,82

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =  
9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R<sub>t</sub> = 15,3 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

Tabelle 1:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Epothilon C und Epothilon D in  $[\text{D}_6]$  DMSO bei 300 MHz

Epothilon C				Epothilon D		
H-Atom	$\delta$ (ppm)	C-Atom	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	C-Atom	$\delta$ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7
21-H <sub>1</sub>	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5
22-H <sub>1</sub>	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4
23-H <sub>1</sub>	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4
24-H <sub>1</sub>	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9
25-H <sub>1</sub>	0.90			0.91	27	14.1
26-H <sub>1</sub>				1.63		
27-H <sub>1</sub>	2.10			2.11		

\*, \*\* Zuordnung vertauschbar



**Beispiel 2:****Epothilon A und 12,13-Bisepi-epothilon A aus Epothilon C**

50 mg Epothilon A werden in 1.5 ml Aceton gelöst und mit 1.5 ml einer 0.07 molaren Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton versetzt. Nach 6 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und durch präparative HPLC an Kieselgel (Laufmittel: Methyl-tert.butylether/Petrolether/Methanol 33:66:1) getrennt.

**Ausbeute:**

25 mg Epothilon A,  $R_t = 3,5$  min (analyt. HPLC, 7  $\mu$ m, Säule 4 x 250 mm, Laufmittel s. o., Fluß 1.5 ml/min)

und

20 mg 12,13-Bisepi-epothilon A,  $R_t = 3.7$  min, ESI-MS (pos. Ionen)

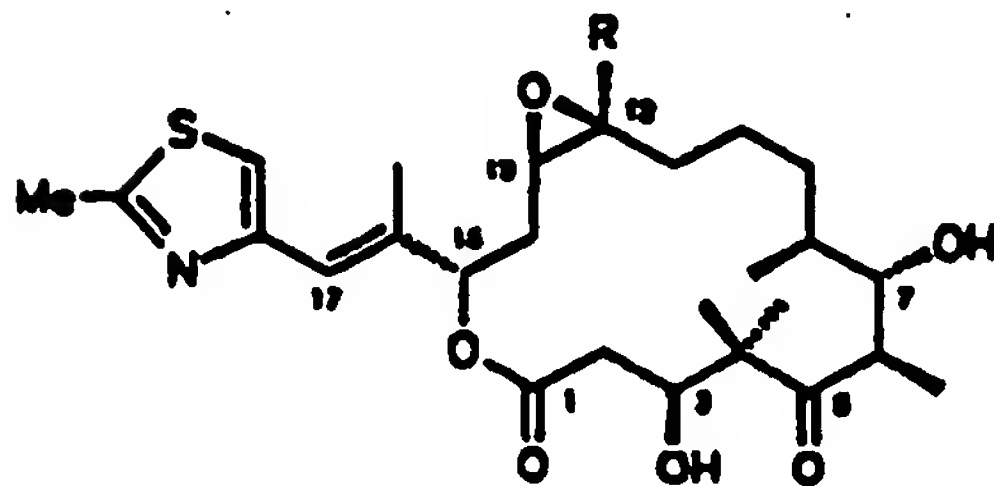
$m/z = 494$   $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  in  $[\text{D}_4]$  Methanol, ausgewählte Signale:  $\delta = 4.32$

(3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H),

3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69

(17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).



12,13-Bisepi-epothilon A    R = H

**Beispiel 3:**

**Epothilone E und F, neue Biotransformationsprodukte der Epothilone A und B.**

**Produktionsstamm:**

Der Produktionsstamm *Sorangium cellulosum* So ce90 wurde im Juli 1985 an der GBF aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi isoliert und am 28.10.91 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter Nr. DSM 6773 hinterlegt.

Die Charakterisierung des Produzenten sowie die Kulturbedingungen sind beschrieben in:

Höfle, G.; N. Bedorf, K. Gerth & H. Reichenbach: Epothilone, deren Herstellungsverfahren sowie sie enthaltende Mittel. DE 41 38 042 A1, offengelegt am 27. Mai 1993.

**Bildung der Epothilone E und F während der Fermentation:**

Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l Bioreaktor wird mit 60 l Medium (0,8 % Stärke; 0,2 % Glucose; 0,2 % Soyamehl; 0,2 % Hefeextrakt; 0,1 %  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 %  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7,4) gefüllt. Zusätzlich werden 2 % Adsorberharz (XAD-16, Rohm & Haas) zugegeben. Das Medium wird durch Autoklavieren (2 Std., 120 °C) sterilisiert. Beimpft wird mit 10 l einer im gleichen Medium (zusätzlich 50 mM HEPES-Puffer pH 7,4) im Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 Upm, 30 °C). Fermentiert wird bei 32 °C mit einer Rührergeschwindigkeit von 500 Upm und einer Belüftung von 0,2  $\text{Nl pro m}^3$  und Std, der pH Wert wird durch Zugabe von KOH bei 7,4 gehalten. Die Fermentation dauert 7 bis 10 Tage. Die gebildeten Epothilone werden während der Fermentation kontinuierlich an das Adsorberharz gebunden. Nach Abtrennen der Kulturbrühe (z. B. durch Zentrifugieren, in einem Proz Sfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewa-

schen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Das Eluat wird zur Trockne eingeeengt und in 700 ml Methanol aufgenommen.

#### **HPLC-Analyse des XAD-Eluates:**

Gegenüber dem Ausgangsvolumen des Reaktors (70 l) ist das Eluat 100:1 konzentriert. Die Analyse wird durchgeführt mit einer HPLC Anlage 1090 der Fa. Hewlett Packard. Zur Trennung der Inhaltstoffe wird eine Microbore Säule (125/2 Nucleosil 120-5 C<sub>18</sub>) der Fa. Machery-Nagel (Düren) verwendet. Eluiert wird mit einem Gradienten aus Wasser/Acetonitril von anfänglich 75:25 bis zu 50:50 nach 5,5 Minuten. Dieses Verhältnis wird bis zur 7. Minute gehalten, um dann bis zur 10. Minute auf 100 % Acetonitril anzusteigen.

Gemessen wird bei einer Wellenlänge von 250 nm und einer Bandbreite von 4 nm. Die Dioden Array Spektren werden im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm gemessen. Im XAD-Eluat fallen zwei neue Substanzen mit R<sub>t</sub> 5,29 und R<sub>t</sub> 5,91 auf, deren Adsorptionsspektren mit denen von Epothilonen A bzw. B identisch sind (Abb. 1; E entspricht A, F entspricht B). Diese Substanzen werden unter den gegebenen Fermentationsbedingungen nur in Spuren gebildet.

#### **Biotransformation von Epothilon A und B zu Epothilon E und F:**

Für die gezielte Biotransformation wird eine 4 Tage alte, mit Adsorberharz gehaltene 500 ml Kultur von So ce90 verwendet. Von dieser werden 250 ml unter Zurücklassen des XAD in einen sterilen 1 l Erlenmeyerkolben überführt. Danach wird eine methanolische Lösung einer Mischung von insgesamt 36 mg Epothilon A und 14 mg Epothilon B zugegeben und der Kolben für zwei Tage bei 30 °C und 200 Upm auf einer Schütteltruhe inkubiert. Die Bildung der Epothilone E und F wird direkt aus 10 µl des zentrifugierten Kulturüberstands analysiert (Abb. 2). Die Umwandlung erfolgt nur

in Gegenwart der Zellen und ist abhängig von der eingesetzten Zelldichte und der Zeit. Eine Kinetik der Umwandlung ist für Epothilon A in Abb. 3 dargestellt.

#### Isolierung von Epothilon E und F

Zur Isolierung von Epothilon E und F werden drei Schüttelkolbenansätze aus der Biotransformation (s. o.) vereinigt und 1 h mit 20 ml XAD-16 geschüttelt. Das XAD wird durch Absieben gewonnen und mit 200 ml Methanol eluiert. Das Eluat wird i. Vak. zu 1.7 g Rohextrakt eingedampft. Dieser wird zwischen 30 ml Ethylacetat und 100 ml Wasser verteilt. Aus der Ethylacetatphase werden beim Eindampfen i. Vak. 330 mg eines öligen Rückstandes erhalten, die in fünf Läufen über eine 250 x 20 mm RP-18 Säule chromatographiert werden (Laufmittel: Methanol/Wasser 58:42, Detektion 254 nm).

Ausbeute: Epothilon E 50 mg  
F 10 mg

#### Biologische Wirkung von Epothilon E:

In Zellkulturen wurde die Konzentration bestimmt, welche das Wachstum um 50 % reduziert (IC<sub>50</sub>) und mit den Werten für Epothilon A verglichen.

<u>Zelllinie</u>	<u>IC<sub>50</sub> (ng/ml)</u>	
	<u>Epothilon E</u>	<u>Epothilon A</u>
HeLa. KB-3.1 (human)	5	1
Mausfibroblasten, L929	20	4

**Epothilon E**

C26H39HO7S [509]

ESI-MS: (positiv Ionen): 510.3 für  $[M+H]^+$

DC:  $R_f = 0,58$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm.. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C

HPLC:  $R_t = 5,0$  min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 250 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 60:40

Fluß: 1,2 ml/min

Detektion: Diodenarray

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.38$  (2- $\text{H}_a$ ), 2.51 (2- $\text{H}_b$ ), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- $\text{H}_2$ , 10- $\text{H}_2$ , 11- $\text{H}_2$ ), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14- $\text{H}_a$ ), 2.07 (14- $\text{H}_b$ ), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21- $\text{H}_2$ ), 1.05 (22- $\text{H}_3$ ), 1.32 (23- $\text{H}_3$ ), 1.17 (24- $\text{H}_3$ ), 0.97 (25- $\text{H}_3$ ), 2.04 (27- $\text{H}_3$ )

**Epothilon F**

C27H41NO7S [523]

ESI-MS: (positiv Ionen): 524.5 für  $[M+H]^+$

DC:  $R_f = 0,58$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:  $R_t = 5,4$  min

Säule: Nucleosil 100 C-18  $7\mu\text{m}$ ,  $250 \times 4$  mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 60:40

Fluß: 1,2 ml/min

Detektion: Diodenarray

$^1\text{H-NMR}$  (300  $\text{MHz}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.37$  (2- $\text{H}_a$ ),  $2.52$  (2- $\text{H}_b$ ),  $4.20$  (3- $\text{H}$ ),  $3.27$  (6- $\text{H}$ ),  $3.74$  (7- $\text{H}$ ),  $1.30 - 1.70$  (8- $\text{H}$ , 9- $\text{H}_2$ , 10- $\text{H}_2$ , 11- $\text{H}_2$ ),  $2.78$  (13- $\text{H}$ ),  $1.91$  (14- $\text{H}$ ),  $2.06$  (14- $\text{H}_b$ ),  $5.42$  (15- $\text{H}$ ),  $6.58$  (17- $\text{H}$ ),  $7.10$  (19- $\text{H}$ ),  $4.89$  (21- $\text{H}_2$ ),  $1.05$  (22- $\text{H}_3$ ),  $1.26$  (23- $\text{H}_3$ ),  $1.14$  (24- $\text{H}_3$ ),  $0.98$  (25- $\text{H}_3$ ),  $1.35$  (26- $\text{H}_3$ ),  $2.06$  (27- $\text{H}_3$ ).

#### Beispiel 4:

Herstellung von Epothilon E und F durch Biotransformation mit *Sorangium cellulosum* So ce90

##### 1) Durchführung der Biotransformation:

Für die Biotransformation wird eine Kultur von *Sorangium cellulosum* So ce90 verwendet, die für vier Tage in Gegenwart von 2 % XAD 16 Adsorberharz (Fa. Rohm und Haas, Frankfurt/M.) bei  $30^\circ\text{C}$  und 160 Upm geschüttelt wurde. Das Kulturmedium hat folgende Zusammensetzung in g/Liter destilliertem Wasser: Kartoffelstärke (Maizena), 8; Glucose (Maizena), 8; entfettetes Sojamehl, 2; Hefeextrakt (Marcor), 2; Ethylendiamintetraessigsäure, Eisen (III) Natrium Salz, 0,008;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1;  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1; HEPES 11,5. Der pH-Wert wird vor dem Autoklavieren mit KOH auf 7,4 eingestellt. Das XAD wird durch Sieben über ein Edelstahl-sieb ( $200 \mu\text{m}$  Maschenweite) von der Kultur abgetrennt. Die Bakterien werden durch Zentrifugation für 10 min bei 10 000 Upm sedimentiert und das Pellet in 1/5 des Kulturüberstandes resuspendiert. Zu der konzentrierten Bakteriensuspension wird nun Epothilon A bzw. Epothilon B in methanolischer Lösung in einer Kon-

zentration von 0,5 g/Liter zugesetzt. Die Kultur wird wie oben beschrieben weiterkultiviert. Zur Analyse der Biotransformation wird zu den gewünschten Zeiten eine 1 ml Probe entnommen, 0,1 ml XAD zugegeben und die Probe für 30 min bei 30 °C geschüttelt. Eluiert wird das XAD mit Methanol. Das Eluat wird zur Trockene eingeeengt und in 0,2 ml Methanol wieder aufgenommen. Diese Probe wird über HPLC analysiert.

Abb. 4) Kinetik der Biotransformation von Epothilon A nach Epothilon E

Abb. 5) Kinetik der Biotransformation von Epothilon B nach Epothilon F.

2) Herstellung von Epothilon E durch Biotransformation von 1 g Epothilon A.

Der Stamm *Sorangium cellulosum* So ce90 wird für vier Tage in 8,5 l des obigen Mediums (jedoch ohne XAD Zusatz) in einem 10 Liter Bioreaktor bei 30 °C, einer Drehzahl von 150 Upm und einer Belüftung von 0,1 vvm angezogen.

Anschließend wird die Kultur durch cross flow Filtration auf 3 l eingeeengt. Hierzu werden 0,6 m<sup>2</sup> einer Membran mit einer Porengröße von 0,3 µm verwendet.

Die konzentrierte Kultur wird in einen 4 Liter Bioreaktor überführt und eine methanolische Lösung von 1 g Epothilon A in 10 ml Methanol zugegeben. Anschließend wird die Kultur über einen Zeitraum von 21,5 h weiterkultiviert. Die Temperatur beträgt 32 °C, die Rührerdrehzahl 455 Upm und die Belüftung erfolgt mit 6 l/min. Zum Erntezeitpunkt wird 100 ml XAD zugegeben und für 1 h weiterinkubiert. Das XAD wird durch Absieben von den Zellen abgetrennt und erschöpfend mit Methanol eluiert. Das konzentrierte Eluat wird über HPLC analysiert.



## Bilanzierung der Biotransformation:

Epothilon A eingesetzt:	1000 mg	= 100 %
Epothilon A nach 21,5 h wiedergefunden:	53,7 mg	= 5,4 %
Epothilon E nach 21,5 h gebildet:	661,4 mg	= 66,1 %
Epothilon A vollständig abgebaut:		= 28,5 %

## Versuch 5:

Die erfindungsgemäßen Epothilone wurden mit Zellkulturen (Tabelle 2) und auf Polymerisationsförderung (Tabelle 3) getestet.

Tabelle 2:

## Epothilon-Tests mit Zellkulturen

Epothilon	A 493	B 507	C 477	D 491	E 509	F 523
	IC-50 [ng/ml]					
Mausfibroblasten L 929	4	1	100	20	20	1,5
<u>humane Tumorzelllinien:</u>						
HL-60 (Leukämie)	0.2	0.2	10	3	1	0,3
K-562 (Leukämie)	0.3	0.3	20	10	2	0,5
U-937 (Lymphom)	0.2	0.2	10	3	1	0,2
KB-3.1 (Cervixkarzinom)	1	0.6	20	12	5	0,5
KB-V1 (Cervixkarzinom multires)	0.3	0.3	15	3	5	0,6
A-498 (Nierenkarzinom)	-	1.5	150	20	20	3
A-549 (Lungenkarzinom)	0.7	0.1	30	10	3	0,1

Tabelle 3:

## Polymerisationstest mit Epothilonen

Parameter: Zeit bis zur halbmaximalen Polymerisation der Kontrolle

Messung:	w	x	y	z	Mittel	Mittel
					[s]	[%]
Kontrolle	200	170	180	210	190	100
Epothilon A	95	60	70	70	74	39
Epothilon B		23	25	30	26	14
Epothilon C	125	76	95	80	94	49
Epothilon D	125	73	120		106	56
Epothilon E	80	60	50	45	59	31
Epothilon F	80	40	30	50	50	26


Standardtest mit 0,9 mg Tubulin/ml und 1  $\mu$ M Probenkonzentration

Der Polymerisationstest ist ein in vitro Test mit gereinigtem Tubulin aus Schweinehirn. Die Auswertung erfolgt photometrisch. Polymerisationsfördernde Substanzen wie die Epothilone verkürzen die Zeit, bis zu der halbmaximale Polymerisation erfolgt ist, d. h., je kürzer die Zeit, desto wirksamer die Verbindung. w, x, y und z sind vier unabhängige Versuche, die relative Wirksamkeit ist in der letzten Spalte in % der Kontrolle ausgedrückt; wieder zeigen die niedrigsten Werte die beste Wirksamkeit an. Die Rangliste entspricht ziemlich genau der in Zellkulturen festgestellten.

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE  
INTERNATIONAL FORM**

Gesellschaft für  
Biotechnologische  
Forschung mbH  
Mascheroder Weg 1  
3300 Braunschweig

**VIABILITY STATEMENT**  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

<b>I. DEPOSITOR</b>	<b>II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>
Name: Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Address: Mascheroder Weg 1 3300 Braunschweig	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  DSM 6773  Date of the deposit or of the transfer <sup>1</sup> :  1991-10-28
<b>III. VIABILITY STATEMENT</b>	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1991-10-28. <sup>2</sup> On that date, the said microorganism was  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no longer viable	
<b>IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED<sup>4</sup></b>	
<b>IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: DEM DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Address: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):    Date: 1991-11-05


- <sup>1</sup> Indicate the date of original deposit or date of the transfer, or, where deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- <sup>2</sup> In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- <sup>3</sup> Mark with a cross the applicable box.
- <sup>4</sup> Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

**INTERNATIONAL FORM**

**Gesellschaft für  
Biotechnologische  
Forschung mbH  
Mascheroder Weg 1  
3300 Braunschweig**

**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page**

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification references given by the DEPOSITOR  <b>So ce 90</b>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  <b>DSM 6773</b>
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I. above was accompanied by:  (    ) a scientific description ( X ) a proposed taxonomic designation  (Mark with a cross where applicable)	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depositary Authority accepts this microorganism identified under I. above, which was received by it on <b>1991-10-28</b> (Date of original deposit) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</b>	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: <b>DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</b>  Address: <b>Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig</b>	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):   Date: <b>1991-11-05</b>

<sup>1</sup> When Rule 6.2(d) applies, each date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

### Patentansprüche

1. Epothilone, dadurch gewinnbar, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert,
- (b) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt und mit einem Wasser/Methanol-Gemisch wäscht,
- (c) das gewaschene Adsorberharz mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,
- (d) das gewonnene Konzentrat mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und zwischen Methanol und Hexan verteilt,
- (e) die methanolische Phase zu einem Raffinat einengt und das Konzentrat an einer Sephadex-Säule fraktioniert,
- (f) eine Fraktion mit Stoffwechselprodukten des eingesetzten Mikroorganismus gewinnt,
- (g) die gewonnene Fraktion an einer C18-Umkehrphase mit einem Methanol/Wasser-Gemisch chromatographiert und in zeitlicher Reihenfolge

- 
- nach einer ersten Fraktion mit Epothilone A und
  - einer zweiten Fraktion mit Epothilone B

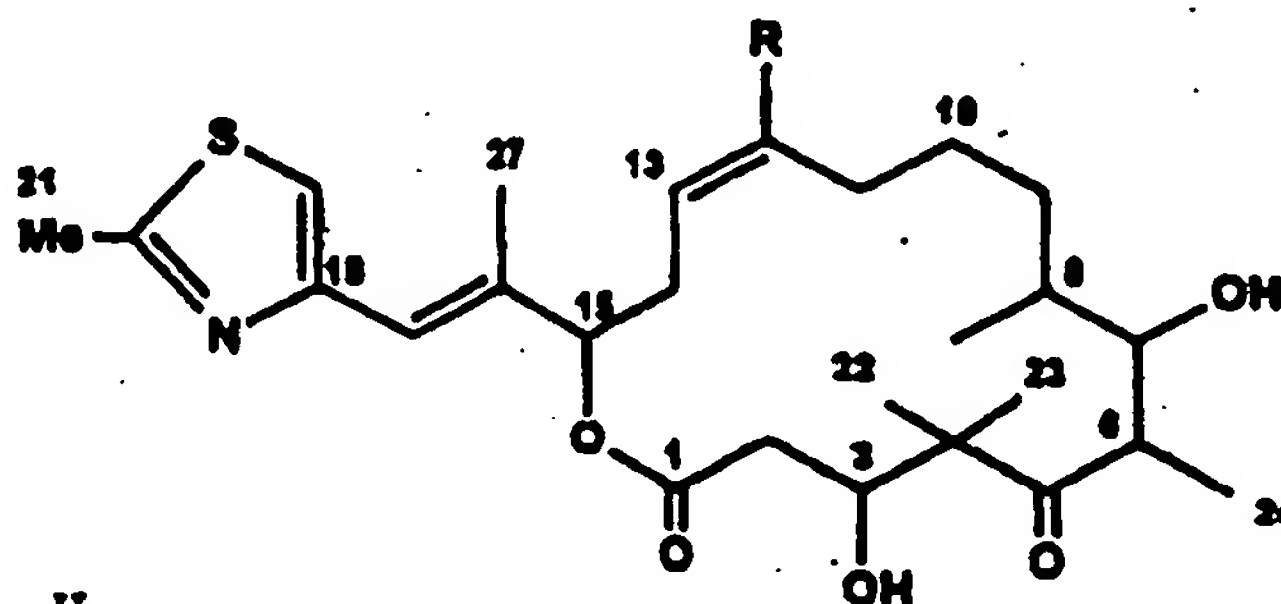
- eine dritte Fraktion mit einem ersten weiteren Epothilon und
- eine vierte Fraktion mit einem zweiten weiteren Epothilon gewinnt und

(h1) und das Epothilon der ersten weiteren Fraktion und /oder

(h2) das Epothilon der zweiten weiteren Fraktion isoliert.

2. Epothilon der Summenformel  $C_{26}H_{39}NO_5S$ , gekennzeichnet durch das  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

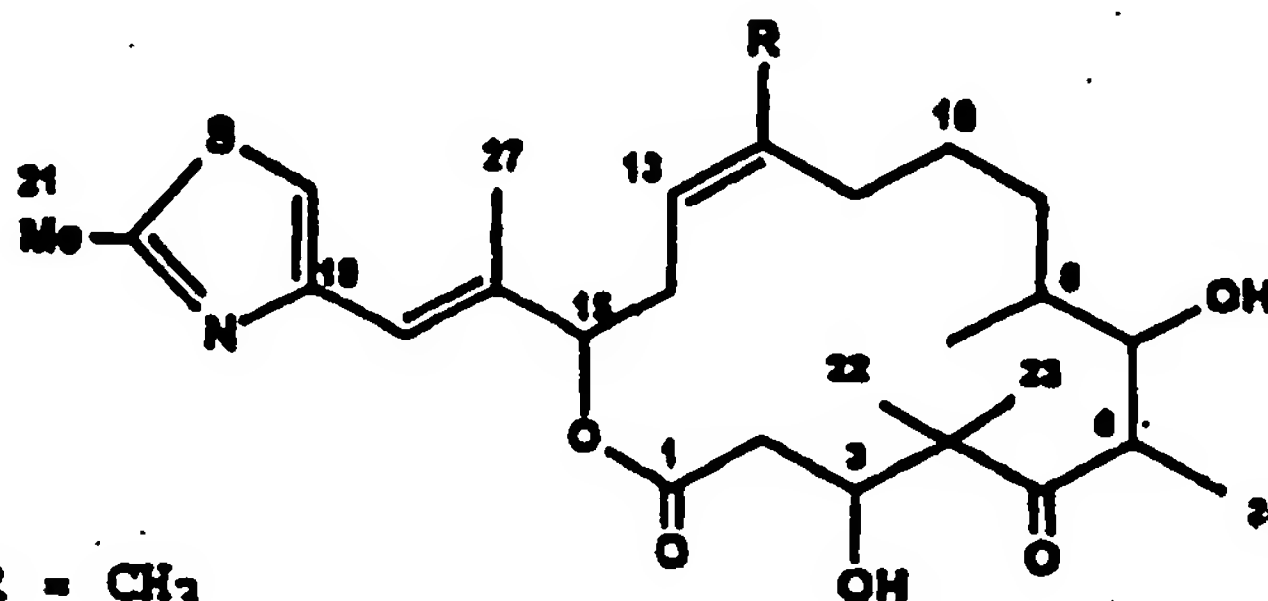
3. Epothilon C der Formel:



Epothilon C     $R = H$

4. Epothilon der Summenformel  $C_{27}H_{41}NO_5S$ , gekennzeichnet durch das  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

5. Epothilon D der Formel:



Epothilon D     $R = CH_3$

6. Biotransformant von Epothilon A, dadurch gekennzeichnet, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon A versetzt,
- (b) die mit Epothilon A versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,
- (c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,
- (d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,
- (e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial: Nucleosil 100 C-18 7 µm  
Säulenmaße: 250 x 16 mm  
Laufmittel: Methanol/Wasser = 60 : 40  
Fluß: 10 ml/min

und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem  $R_t$ -Wert von 20 min abtrennt und den Biotransformanten isoliert.

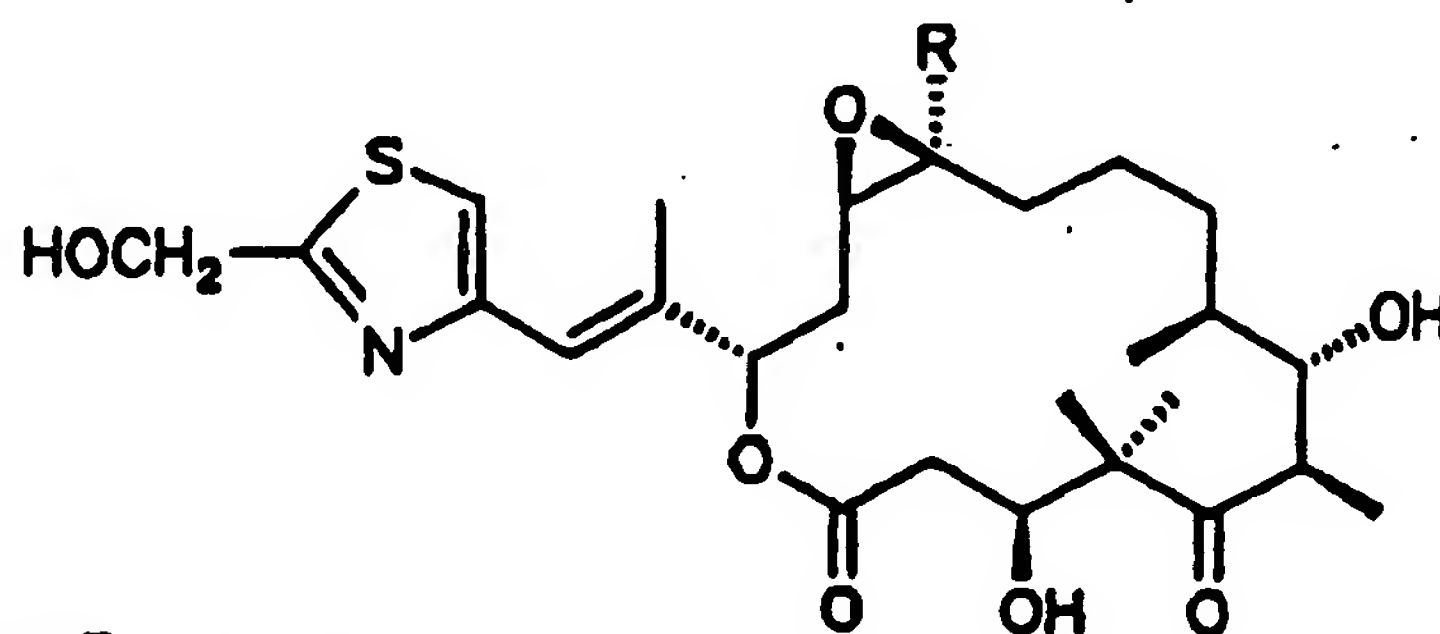
7. Biotransformant von Epothilon A nach Anspruch 6, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

8. Biotransformant von Epothilon A nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei oder mehr Tage inkubiert.



9. Verbindung der Summenformel  $C_{26}H_{39}NO_7S$ , gekennzeichnet durch folgendes  $^1H$ -NMR-Spektrum (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 2.38$  (2- $H_a$ ), 2.51 (2- $H_b$ ), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- $H_2$ , 10- $H_2$ , 11- $H_2$ ), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14- $H_a$ ), 2.07 (14- $H_b$ ), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21- $H_2$ ), 1.05 (22- $H_3$ ), 1.32 (23- $H_3$ ), 1.17 (24- $H_3$ ), 0.97 (25- $H_3$ ), 2.04 (27- $H_3$ )

10. Verbindung (Epothilon E) der Formel:



Epothilon E      $R = H$

11. Biotransformant von Epothilon B, dadurch gewinnbar, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon B versetzt,
- (b) die mit Epothilon B versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,
- (c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,

- (d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,
- (e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial: Nucleosil 100 C-18 7  $\mu$ m  
Säulenmaße: 250 x 16 mm  
Laufmittel: Methanol/Wasser = 60 : 40  
Fluß: 10 ml/min

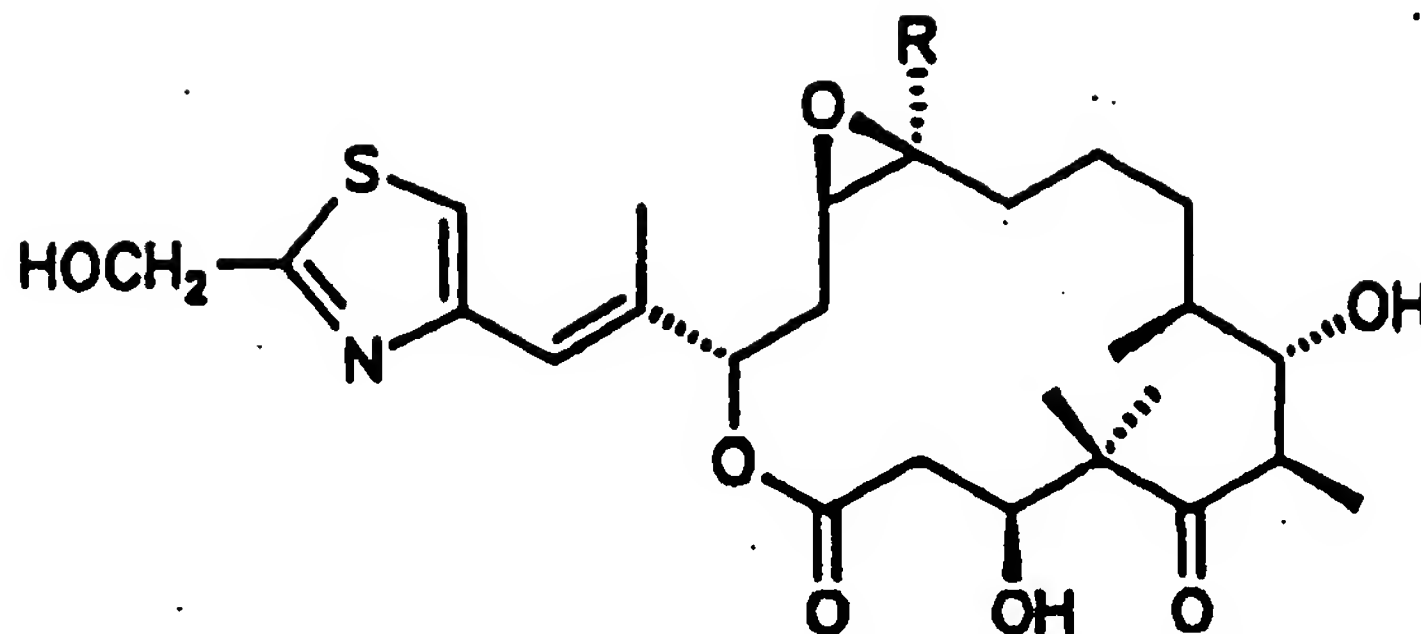
und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem  $R_t$ -Wert von 24,5 min abtrennt und den Biotransformanten isoliert.

12. Biotransformant nach Anspruch 11, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

13. Biotransformant nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei oder mehr Tage inkubiert.

14. Verbindung der Summenformel  $C_{27}H_{41}NO_7S$ , gekennzeichnet durch folgendes  $^1H$ -NMR-Spektrum (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 2.37 (2- $H_a$ ), 2.52 (2- $H_b$ ), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- $H_2$ , 10- $H_2$ , 11- $H_2$ ), 2.78 (13-H), 1.91 (14-H), 2.06 (14- $H_b$ ), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H), 7.10 (19-H), 4.89 (21- $H_2$ ), 1.05 (22- $H_3$ ), 1.26 (23- $H_3$ ), 1.14 (24- $H_3$ ), 0.98 (25- $H_3$ ), 1.35 (26- $H_3$ ), 2.06 (27- $H_3$ )

15. Verbindung (Epothilon F) der Formel:

Epothilone F    R = CH<sub>3</sub>

16. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

17. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehreren der Verbindungen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche oder einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).



Fig. 1

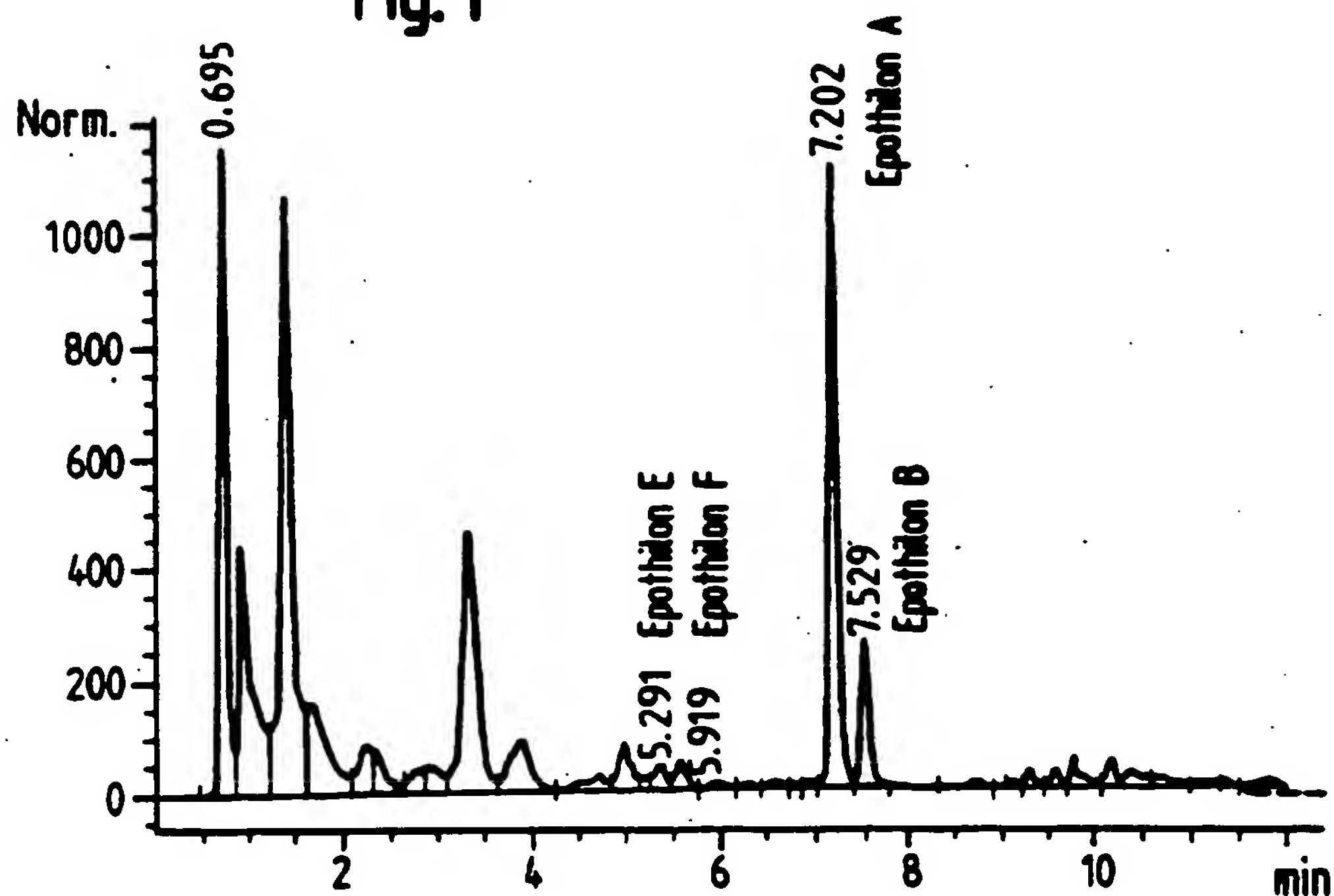
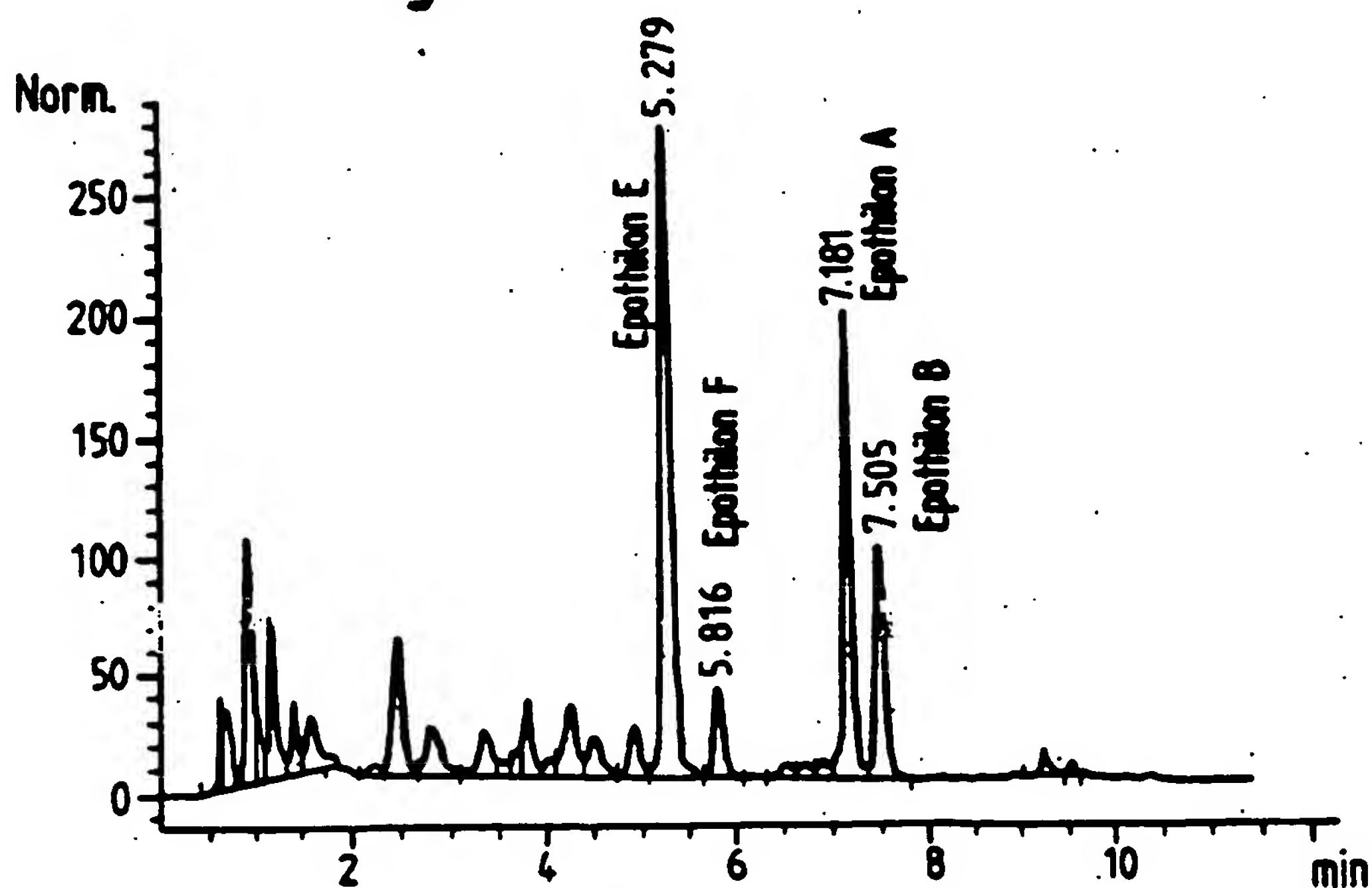


Fig. 2





2 / 3

Fig. 3

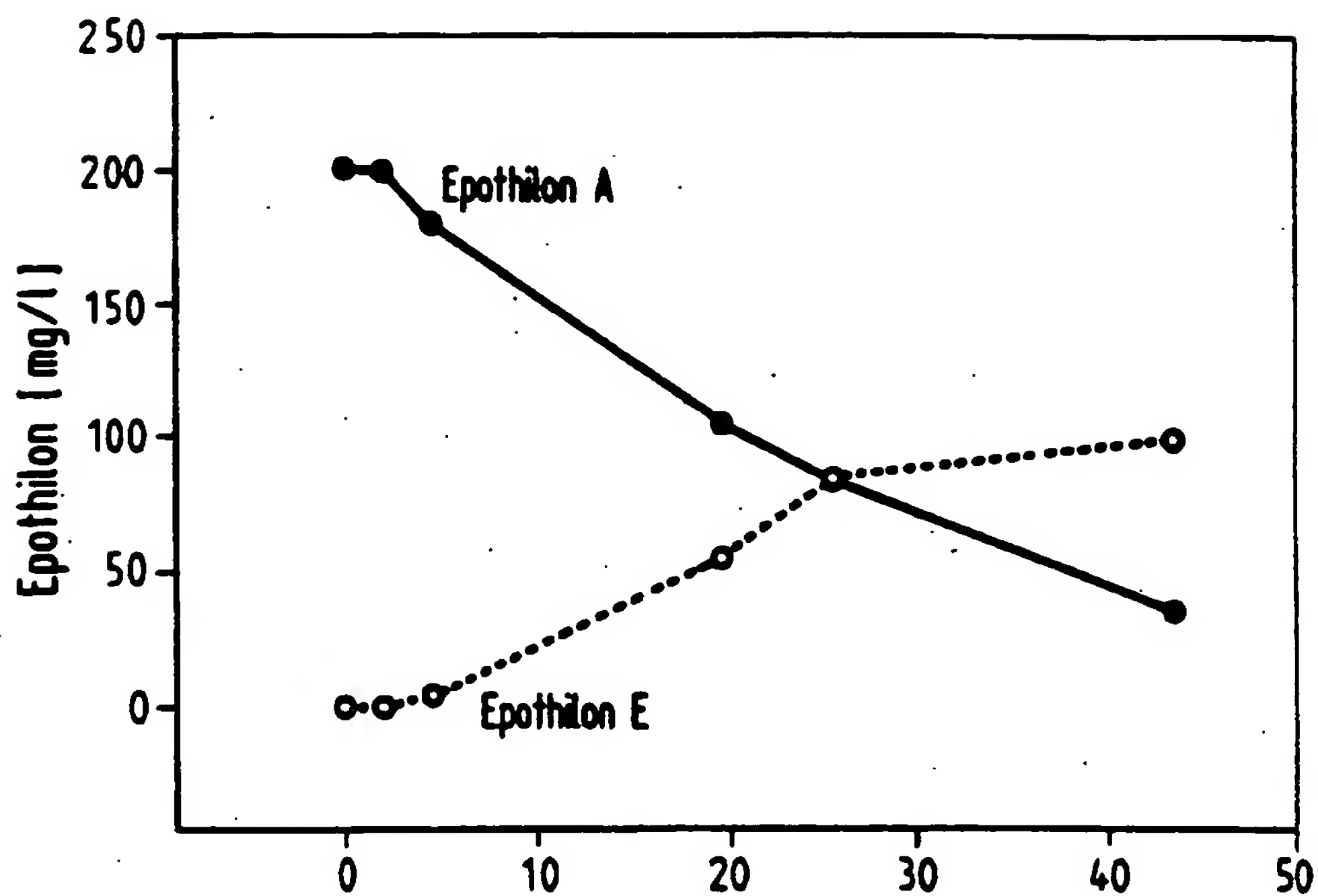


Fig. 4

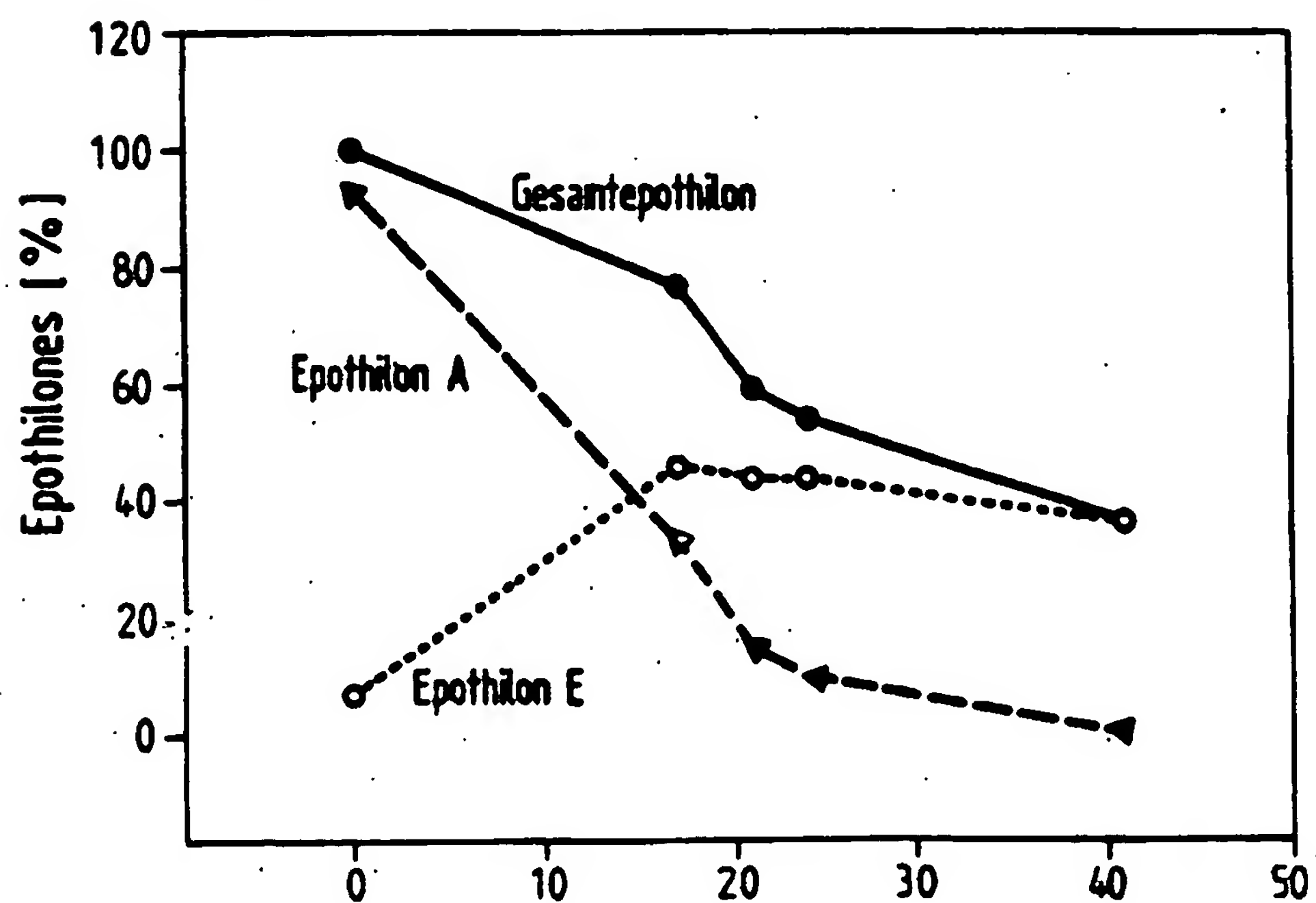
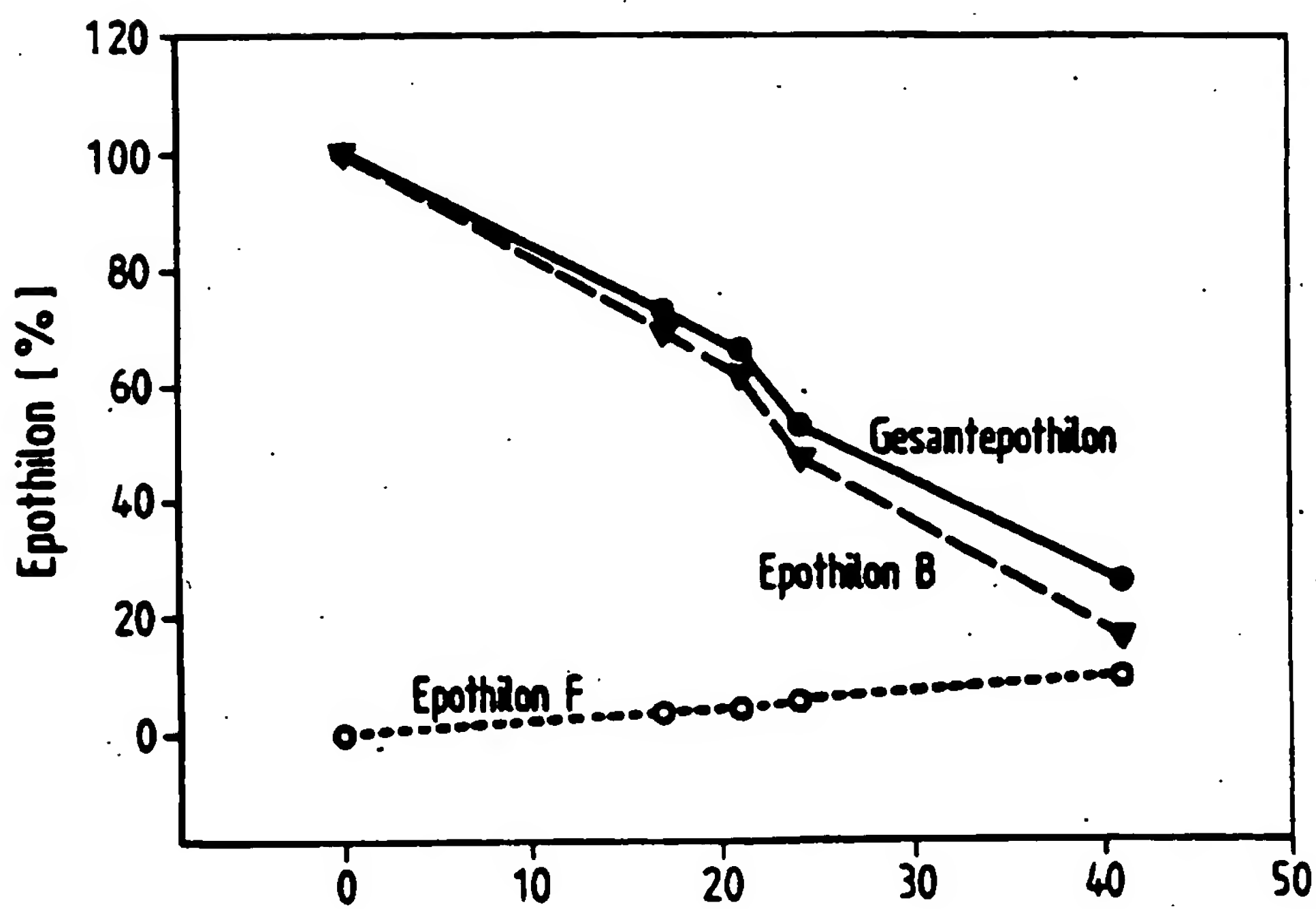






Fig. 5



1999

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.

PCT/EP 97/86442

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07D417/06 C07D493/04 C12P17/08 A01N43/78 A61K31/425  
 //(C07D493/04,313:00,303:00)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) & CIBA GEIGY AG) 27 May 1993 see claims 1,5-8 & DE 41 38 042 A (GBF) 27 May 1993 cited in the application ---	1,16,17
P,X	BALOG A. ET AL.: "Total synthesis of (-)-epothilone A" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, vol. 35, no. 23/24, 3 January 1997, pages 2801-2803, XP002035359 see compound 23; page 2803 --- -/-	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*U\* document relevant to the patentability of the invention

Date of the actual completion of the international search

27 March 1998

Date of mailing

6. 6. 98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 2911 Patentstrasse 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2000, Tx. 31 051 ops nl  
 Fax: (+31-70) 340-3010

Authorized officer

Hartrampf. G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interv. and Application No  
PCT/EP 97/06442

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 97 19886 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF)) 29 May 1997 cited in the application see page 22 - page 26; claims 12,13; example 15	1-5,10, 16,17
E	--- WO 98 08849 A (NOVARTIS AKTIENGESELLSCHAFT) 5 March 1998 see compounds 19 and 19a, page 32 see claims 2,9	2-5
A	--- NICOLAOU K.C. ET AL.: "An approach to epothilones based on olefin metathesis" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, vol. 35, no. 20, 4 November 1996, pages 2399-2401. XP002035372 -----	1-17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Appl. No.  
PCT/EP 97/06442

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9310121 A	27-05-93	DE 4138042 A	27-05-93
		AU 2943792 A	15-06-93
-----			
WO 9719086 A	29-05-97	DE 19542986 A	22-05-97
		DE 19639456 A	26-03-98
-----			
WO 9808849 A	05-03-98	DE 19636343 C	23-10-97
-----			

1971



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Anmelde-Aktenzeichen

PCT/EP 97/06442

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07D417/06 C07D493/04 C12P17/08 A01N43/78 A61K31/425  
 //(C07D493/04,313:00,303:00)

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfgebiet (Qualifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfgebiet gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) & CIBA GEIGY AG) 27.Mai 1993 siehe Ansprüche 1,5-8 & DE 41 38 042 A (GBF) 27.Mai 1993 in der Anmeldung erwähnt	1,16,17
P,X	BALOG A. ET AL.: "Total synthesis of (-)-epothilone A" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, Bd. 35, Nr. 23/24, 3.Januar 1997, Seiten 2801-2803, XP002035359 siehe Verbindung 23; Seite 2803	1-3



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Stichtag Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere Bedeutung anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei zu beweisen zu lassen, oder durch die die Veröffentlichungsdaten einer anderen in Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (z.B. ausgetauscht)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Beratung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsbasierender Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsbasierender Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nachvollziehbar ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. März 1998

Abschlussdatum des internationalen Recherchenberichts

09. 04. 98

Name und Postanschrift der internationalen Recherchebehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 0018 Patenthaus 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2000, Tx. 31 051 apo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3010

Berechtigter Bediensteter

Hartrampf, G

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Pat. Aktenzeichen

PCT/EP 97/06442

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEHÖRIGES UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
P,X	WO 97 19086 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF)) 29.Mai 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 22 - Seite 26; Ansprüche 12,13; Beispiel 15 ---	1-5,10, 16,17
E	WO 98 08849 A (NOVARTIS AKTIENGESELLSCHAFT) 5.März 1998 siehe Verbindungen 19 und 19a, Seite 32 siehe Ansprüche 2,9 ---	2-5
A	NICOLAOU K.C. ET AL.: "An approach to epothilones based on olefin metathesis" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, Bd. 35, Nr. 20, 4.November 1996, Seiten 2399-2401, XP002035372 -----	1-17

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. oder Abkürzungen

PCT/EP 97/06442

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9310121 A	27-05-93	DE 4138042 A	27-05-93
		AU 2943792 A	15-06-93
-----			
WO 9719086 A	29-05-97	DE 19542986 A	22-05-97
		DE 19639456 A	26-03-98
-----			
WO 9808849 A	05-03-98	DE 19636343 C	23-10-97
-----			